Aus dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. R. Jacob
Lehrstuhl I: Professor Dr. med. E. Betz

Sauerstoffverbrauch und Lactatproduktion experimentell erzeugter Intimaproliferate der Arteria Carotis Communis des Kaninchens

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Chem. Dr. rer. nat. HERMANN EBERHARD KNEHR
aus Breslau

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. R. Jacob
Lehrstuhl I: Professor Dr. med. E. Betz

Sauerstoffverbrauch und Lactatproduktion experimentell erzeugter Intimaproliferate der Arteria Carotis Communis des Kaninchens

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Chem. Dr. rer. nat. HERMANN EBERHARD KNEHR
aus Breslau

1984

Dekan:	Professor Dr. med. G. Fichtner
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. E. Betz
2. Berichterstatter:	Professor Dr. rer. nat. K. Reutter

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	2
1.1. Bisherige Untersuchungen über den Einfluß von Sauerstoff auf die Entwicklung atheromatöser Gefäßwandveränderungen	2
1.2. Problemstellung	7
2. Methoden	9
2.1. Tiermodell zur Atheromerzeugung	9
2.2. Apparatur zur Messung des Sauerstoffverbrauchs kleiner Gewebeproben	13
2.3. Biochemische Untersuchungen	
2.3.1. Bestimmung von Lactat	20
2.3.2. Bestimmung von DNA im Gewebe	21
2.4. Histochemische Untersuchungen	
2.4.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Monoamine	21
2.4.2. Histochemischer Nachweis der Aktivität von Succinat-Dehydrogenase (SDH)	22
2.4.3. Histochemischer Nachweis der Aktivität von Lactat-Dehydrogenase (LDH)	22
3. Ergebnisse	
3.1. DNA-Gehalt der untersuchten Gewebeproben	24
3.2. Sauerstoffverbrauch und Lactatproduktion der gereizten und kontralateralen Arteria carotis communis unter in vitro Inkubationsbedingungen.	
3.2.1. Einfluß von exogenen Substraten	25
3.2.2. Stimulation mit Noradrenalin	28
3.2.3. Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung und Succinat-Stimulation	31
3.3. Histochemische Untersuchungen	34
4. Diskussion	36
5. Zusammenfassung	49
6. Literaturverzeichnis	52

1. Einleitung

Nach unserem heutigen Wissensstand scheint dem Krankheitsbild der Arteriosklerose ein multifaktorielles Geschehen zugrunde zu liegen. Sowohl hämodynamische Faktoren (TEXON,1974; STEHBENS,1974) als auch Stoffwechselstörungen (STOUT,1979; BONDJERS et al.1980) und mechanische Läsionen der Gefäßwand (BENDITT,1974) werden als ursächliche Noxen diskutiert. Auf der Suche nach therapeutischen Ansatzpunkten zur Verhinderung der Arteriosklerose ist es gleichwohl notwendig, einzelne Faktoren, die die Ausbildung arteriosklerotischer Veränderungen begünstigen, zu charakterisieren und auf ihre ursächliche Wirkung in Bezug auf die Atherogenese hin zu untersuchen.

1.1. Bisherige Untersuchungen über den Einfluß von Sauerstoff auf die Entwicklung atheromatöser Gefäßwandveränderungen.

Seit langem wird angenommen,daß Hypoxie die Entstehung atherosklerotischer Plaques in der Gefäßwand fördert (HELIN und LORENZEN,1969; BOATMAN und CARTER,1973), Hyperoxie dagegen mildern oder verhindern kann (KJELDSEN et al.,1969; VESSELINOVITCH et al.,1974). So konnten KJELDSEN et al. (1968) zeigen, daß Kaninchen, die mit Cholesterin angereicherte Nahrung erhielten und in 10%-iger Sauerstoffatmosphäre gehalten wurden, wesentlich stärker ausgeprägte atherosklerotische Veränderungen zeigten, als die Kontrolltiere bei gleicher Ernährung aber in 21% Sauerstoff. Tiere, die in einer Atmosphäre von 28% Sauerstoff gehalten wurden, zeigten dagegen deutlich weniger und in ihrer Schwere schwächer ausgeprägte Läsionen in der Aorta.

Diese Befunde konnten am Menschen bestätigt werden (URSCHEL et al.,1967). Im Rahmen einer Strahlenbehandlung von Patienten mit Malignomen wurde eine Wasserstoff-

peroxidhaltige Lösung in die Bauchaorta infundiert. Bei der Autopsie zeigte sich, daß die Teile der Aorta, die der Peroxidlösung ausgesetzt worden waren, eine wesentlich geringere Anzahl und einen geringeren Schweregrad an atherosklerotischen Läsionen aufwiesen, als die anderen Teile der Aorta.

Mit Hilfe licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen läßt sich zeigen, daß die Reaktion der arteriellen Gefäßwand auf Hypoxie sehr ähnlich den Veränderungen sind, die bei beginnender Atherosklerose gefunden werden: subendotheliales Ödem, Proliferation der Myocyten und Einlagerung von Fetttröpfchen (KJELDSEN et al.,1975). Rasterelektronenmikroskopisch imponiert ein "kopfsteinpflasterähnliches" Bild der Intima (BOATMAN und CARTER,1973; Eitel et al.,1980).

Die Sauerstoffversorgung der Gefäßwand größerer Arterien erfolgt sowohl durch vasa vasorum, als auch per diffusionem direkt vom Gefäßlumen. Typischerweise werden in der Intima und im inneren Drittel der Media keine vasa vasorum gefunden (WOERNER, 1959). Diese Wandschichten sind deshalb besonders anfällig für Hypoxie und Substratmangel. Der Vaskularisierungsgrad der großen Gefäße ist bei verschiedenen Tierspezies unterschiedlich ausgeprägt (WOLINSKY und GLAGOV, 1969). Vergleicht man Tierspezies mit unterschiedlichem Vaskularisationsgrad der Aorta hinsichtlich ihrer Anfälligkeit für Atherosklerose, so findet man, daß atherosklerotische Läsionen umso leichter erzeugt werden können, je geringer der Vaskularisationsgrad, d.h. je größer die avaskuläre innere Gefäßwandschicht ist (SCHLICHTER, 1948). Beim Menschen ist die avaskuläre Zone in der thorakalen Aorta 0.49 $\pm$ 0.04 mm stark, in der abdominalen Aorta 0.72 $\pm$ 0.02 mm (WOLINSKY und GLAGOV, 1969). Auch hier treten im abdominalen Teil der Aorta wesentlich häufiger atherosklerotische Veränderungen auf als im thorakalen Teil.

UNIV. LEIDEN MED.

Mit Hilfe theoretischer Annahmen über den Diffusionskoeffizienten für Sauerstoff im Gewebe und über den Sauerstoffverbrauch in vivo haben KIRK und LAURSEN (1955) für aortales Gewebe eine kritische Dicke von 0.9-1.0 mm berechnet, die von Sauerstoff per diffusionem noch versorgt werden kann. Die avaskuläre Schicht der Aorta älterer Menschen kann die gleiche Größenordnung annehmen (ADAMS und BAYLISS, 1969). Man muß daraus schließen, daß im inneren Drittel der Media physiologischerweise ein sehr niedriger Sauerstoffdruck herrscht, der diese Wandschichten besonders empfindlich macht für Schwankungen des Sauerstoffpartialdruckes im Blut und Verdickungen der Intima.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, den Sauerstoffdruck in der Gefäßwand mit Hilfe von Mikroelektroden direkt zu messen. Die ursprünglich von SILVER (1965) und GULD (1964) angegebenen und später von LÜBBERS et al. (1969, BAUMGÄRTL et al., 1974) weiterentwickelten Platinelektroden waren zu diesem Zweck wenig geeignet, da das elastische Bindegewebe in den Gefäßwänden den Mikroelektroden einen relativ großen Widerstand entgegensetzte, der Diffusionsgrenzstrom der Platinkonuselektroden aber sehr druckabhängig ist. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß in den ersten Arbeiten über Sauerstoffdruckgradienten in der Gefäßwand ein steiler Sauerstoffdruckanstieg beobachtet wurde, wenn die Mikroelektrode in Richtung Intima die Elastica interna durchstoßen hatte und in das Gefäßlumen gelangt war (MOSS et al., 1968; NIINIKOSKI et al., 1973; HEUGHAN et al., 1973). Es ist viel über diesen Ort mit niedrigsten Sauerstoffdruck an der medialen Seite der Elastica interna diskutiert worden, und man glaubte schon hier die Ursache gefunden zu haben, warum erste atherosklerotische Veränderungen sich in diesem Bereich der Gefäßwand ausbilden (SCHNEIDERMAN et al., 1974).

Erst mit der Verwendung von Elektroden, deren sauerstoffsensitive Fläche in einer kleinen Nische an der Elektrodenspitze angeordnet war (WHALEN et al., 1967 und 1973), so daß sie keinem mechanischen Druck ausgesetzt war, wenn die Elektrode durch das Gewebe geschoben wurde, konnte gezeigt werden, daß diese Diffusionsbarriere für Sauerstoff an der Elastica interna nicht existiert. Der Sauerstoffpartialdruck in der Gefäßwand fällt vom Gefäßlumen kommend kontinuierlich ab, erreicht im inneren Drittel der Media ein Minimum und steigt dann in Richtung Adventitia allmählich wieder an (JURRUS und WEISS, 1977).

Verglichen mit dem Sauerstoffdruckprofil der normalen Arterienwand ist der Sauerstoffpartialdruck in atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden stets erniedrigt gefunden worden (HEUGHAN et al.,1973; JURRUS und WEISS, 1977). Dies ist zum Teil auf die Verbreiterung der Intima zurückzuführen, die eine Verlängerung der Diffusionsstrecke für Sauerstoff bedeutet. Um die extrem niedrigen Sauerstoffdrücke befriedigend erklären zu können, müssen jedoch zusätzliche Annahmen gemacht werden: ein kleinerer Diffusionskoeffizient für Sauerstoff in atherosklerotischem Gewebe oder ein erhöhter Sauerstoffverbrauch des Gewebes selbst.

Während über Diffusionskoeffizienten für Sauerstoff in atherosklerotisch verändertem Gewebe relativ wenig bekannt ist (GAINER und CHISOLM, 1974), gibt es eine ganze Reihe von Arbeiten, die sich mit dem Sauerstoffverbrauch des Gewebes und Atherosklerose beschäftigen. So wurde von MUNRO et al. (1961) der Sauerstoffverbrauch von aortalem Gewebe verschiedener Tierspezies untersucht und in Relation gebracht zu der Empfänglichkeit der Tiere für Atherosklerose. Dabei kamen die Autoren zu dem Ergebnis, daß Tiere mit einem relativ hohem

Sauerstoffverbrauch des Gewebes wenig anfällig für Atherosklerose sind, innerhalb einer Tierspezies jedoch die Teile der Gefäßwand besonders starke Läsionen entwickeln, die einen hohen Sauerstoffverbrauch zeigen. WEISS et al. (1971) kamen zu einer entgegengesetzten Aussage. Sie verwendeten Hühnchen als Versuchstiere und konnten zeigen, daß ein geringer Sauerstoffverbrauch der Arterienwand zur Atherosklerose prädisponiert, ein hoher Verbrauch dagegen schützt. Mit beginnender Entwicklung der Plaques nahm jedoch der Sauerstoffverbrauch des Gewebes zu.

Obgleich auch hier unterschiedliche Ergebnisse vorliegen, überwiegen die Arbeiten, in denen ein erhöhter in vitro Sauerstoffverbrauch von atherosklerotischem Gewebe beschrieben wird (WHEREAT, 1961 und 1964; SCOTT et al., 1969; STANGE und PAPENBERG, 1978). Das Ausbildungsstadium der atherosklerotischen Läsionen scheint für den Sauerstoffverbrauch eine entscheidende Rolle zu spielen. So beobachtete MAIER und HAIMOVICI (1965) an Atheromen, die durch Cholesterinfütterung am Kaninchen und Hund erzeugt worden waren, in den ersten 2-4 Monaten eine deutliche Zunahme der Gewebeatmung und in den darauffolgenden 6-8 Monaten eine deutliche Abnahme.

Über die Ursache des erhöhten Sauerstoffverbrauchs herrscht noch weitgehend Unklarheit. Zum Teil wird der erhöhte Sauerstoffverbrauch als Folge einer erhöhten Syntheseleistung der proliferierenden Zellen gesehen, zum Teil wird eine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien der transformierten Myocyten der atherosklerotischen Gefäßwand diskutiert (WHEREAT, 1966), wobei die Störung der Mitochondrien sogar als primäre Noxe der Atherosklerose angesehen wurde (MURRAY et al.,1968).

1.2. Problemstellung

In unserem Arbeitskreis ist ein Tiermodell entwickelt worden, das es gestattet, atherosklerotische Veränderungen in voraussagbarer Größe und definiertem Entwicklungsstadium in der Carotiswand von Kaninchen zu erzeugen (BETZ und SCHLOTE, 1979; EITEL et al.,1980). Durch eine Kombination von transmuraler Elektrostimulation der Gefäßwand und Fütterung der Tiere mit einer cholesterinreichen Diät entwickeln sich unter der Anode atheromatöse Plaques, die den menschlichen Atheromen sehr ähnlich sind.

Im Folgenden wird die metabolische Kapazität dieser experimentell erzeugten atheromatösen Plaques durch Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Laktatproduktion in vitro inkubierter Gewebeproben untersucht. Dabei soll auf folgende Fragen näher eingegangen werden:

Welche exogen zugeführten Substrate können verstoffwechselt werden, besteht ein qualitativer oder quantitativer Unterschied zwischen Proliferaten und der ungereizten Gefäßwand?
Wie hoch ist der Sauerstoffverbrauch bei Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung? Läßt sich der Sauerstoffverbrauch der Proliferate durch Inkubation mit 2,4-Dinitrophenol weniger steigern als bei den Kontrollgefäßen, was ein Hinweis dafür wäre, daß die Mitochondrien in den transformierten Myocyten der Proliferate unter Normalbedingungen bereits partiell entkoppelt wären?
Welchen Einfluß hat der sympathische Nervenplexus auf den Sauerstoffverbrauch der glatten Muskelzellen? Wie verändern sich der Sauerstoffverbrauch und die Laktatproduktion der Mediamyocyten bei vollständiger Präparation der Adventitia? Wie verhalten sich Proliferate und Kontrollgefäße unter dem Einfluß von exogenem Noradrenalin? Ist das Vermögen, Succinat zu oxidieren, verändert

als Hinweis auf eine gestörte Zellmembranpermeabilität?

Die Ergebnisse der Inkubationsversuche werden ergänzt durch die histochemische Demonstration der Aktivität von Succinatdehydrogenase (SDH) und Lactatdehydrogenase (LDH) in Gewebeschnitten der Proliferate und der Kontrollgefäße.

2. Methoden

2.1. Tiermodell zur Atheromerzeugung

Als Versuchstiere wurden männliche Neuseeländer-Kaninchen verwendet (Alter: 1-1.5 Jahre; Gewicht: 2.5-3.5 kg). Am anästhesierten Tier (Nembutal 25mg/kg Körpergewicht) wurde die rechte Arteria carotis communis freigelegt und mit einer 8mm langen Teflonmanschette umgeben. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Manschette einerseits Kontakt mit der Adventitia des Gefäßes hatte, zum anderen, daß das Gefäß während der Pulsationen nicht eingeengt wurde und der Blutstrom nicht behindert wurde. An der Innenseite des ca. 0.1mm dicken Teflonzylinders waren zwei flache Goldelektroden (0.05-0.1 mm Dicke, 1 mm Breite, 8 mm Länge) angebracht, die so angeordnet waren, daß sie nach fertiger Inplantation der Manschette in Bezug auf den Gefäßradius gerade gegenüber lagen. Auf diese Weise konnte das Gefäß transmural stimuliert werden.

Mittels subkutan geführter Kabel wurden die Elektroden mit einem kleinen Steckersockel verbunden, der auf der Schädelkalotte fest verschraubt war (Abb.1). Anode und Kathode waren mit einem Farbcode versehen, so daß die anodische und kathodische Seite der elektrischen Stimulation identifiziert werden konnte. Über den Steckersockel konnten die Tiere mit einem Reizgerät verbunden werden.

Die Versuchstiere wurden täglich 2 mal für eine Dauer von 30 min mit DC-Impulsen (1.5 mA, 1 ms, 10 Hz) stimuliert. Während der Reizung konnten sich die Tiere in geräumigen Boxen frei bewegen. In der übrigen Zeit wurden die Tiere in Einzelkäfigen mit Gitterböden gehalten und erhielten ein Trockenfutter, das mit 2% Cholesterin angereichert war (Altromin 2023, Altrogge Spezialfutterwerk, Lage, BRD) und Wasser ad libitum.

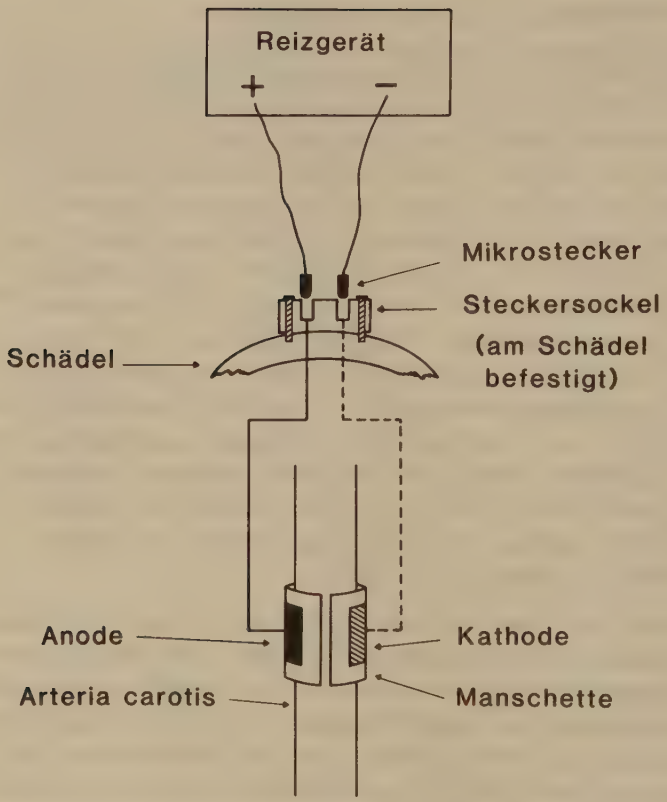

Abb. 1: Schematische Darstellung der Reizanordnung. An der Innenseite der Teflonmanschette waren zwei flache Goldelektroden (0.1 mm Dicke) angebracht. Der Steckersockel bestand aus Plexiglas und wurde mit zwei Edelstahlschrauben auf der Schädelkalotte fixiert.

Nach einer Reizdauer von 4 Wochen wurden den Versuchstieren in Nembutalnarkose die gereizte Arteria carotis und die kontralaterale Arterie entnommen und sofort in 37° C temperierte Tyrodelösung gebracht mit folgender Zusammensetzung (in mM): NaCl 120.0, KCL 5.0, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1.0, $NaHCO_3$ 23.0, NaH_2PO_4 1.2, EDTA 0.01. Die Lösung wurde mit einem Gasgemisch von 5% CO_2, 21% O_2, 74% N_2 äquilibriert und hatte bei 37°C ein pH von 7.44 (KNEHR und LINKE, 1980 und 1982). Je nach Versuchsplan wurde der Lösung noch 5.0 mM Glucose oder ein anderes Substrat in entsprechender Menge zugegeben.

Die Carotiden wurden zunächst in ein speziell für diesen Zweck angefertigtes Präpariergefäß gebracht, das auf 37°C thermostatisiert war und kontinuierlich mit gasäquilibrierter Tyrodelösung durchströmt wurde (Abb. 2).

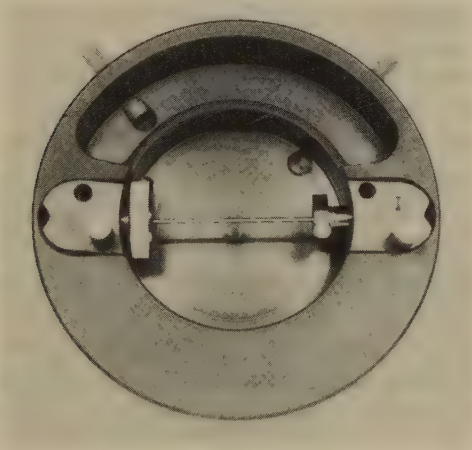

Abb. 2: Thermostatisiertes Präpariergefäß.

Die Gefäßsegmente wurden über eine Edelstahlachse gezogen, die an ihren beiden Enden in der Präparierkammer verankert werden konnte. Auf diese Weise war es möglich, die Gefäße ohne nennenswerte Traumatisierung von den sie umgebenden Fett- und groben Bindegewebe zu befreien.

Unter einem Operationsmikroskop wurde die Manschette von der gereizten Carotis vorsichtig entfernt. Die Stelle der anodischen Reizung konnte an der Gefäßwand leicht identifiziert werden durch die Abscheidung von kolloidalem Gold an der Kontaktstelle. Nach Längsspaltung des Gefäßsegmentes wurde die Plaque an der intimalen Seite deutlich sichtbar. Mit einer Mikroschere wurde nun der Teil der Gefäßwand mit der Plaque herausgeschnitten und bis zur Messung in ein frisches gasdurchperltes Äquilibriergefäß gebracht. Ein Stück Arterienwand aus der kontralateralen Arteria carotis, vergleichbar an Größe und Form, diente als Kontrollpräparat.

Für die Herstellung der Intima-media Präparate wurden zylindrische Gefäßsegmente auf die Stahlachse der Präparierkammer aufgezogen. Unter dem Operationsmikroskop wurde die Adventitia an der Stirnseite des Gefäßzylinders gefaßt und mit einer Mikroschere zwischen Adventitia und Media inzidiert. Hatte man die richtige Schicht gefunden, so ließ sich nun die Tunica adventitia in einem Stück mühelos von der darunterliegenden Tunica media abschälen. Dies konnte stumpf geschehen, ohne die Tunica media zu berühren; eine Traumatisierung der Mediamyocyten konnte auf diese Weise weitgehend ausgeschlossen werden (KNEHR, 1981). Nach Entfernung der Adventitia waren die Plaques durch die Media hindurch gut sichtbar, so daß sie ohne Längsspaltung des Gefäßes exzidiert werden konnten. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei den Gesamtwandpräparaten.

2.2. Apparatur zur Messung des Sauerstoffverbrauchs kleiner Gewebeproben.

Der Sauerstoffverbrauch einer Gewebeprobe in vitro kann gemessen werden, indem man in einem abgeschlossenen Gefäß den Abfall des Sauerstoffpartialdruckes in der Inkubationslösung mit der Zeit bestimmt. Dies kann geschehen durch manometrische Messung des Gasdruckes über der Lösung (sog. Warburg-Apparatur, KOSAN und BURTON, 1965), oder durch polarographische Messung des Sauerstoffpartialdruckes in der Lösung selbst. Für die Messung kleiner Partialdruckschwankungen in kleinen Volumina kommt nur die zweite Methode in Frage. Da es sich bei den zu untersuchenden Präparaten um relativ kleine Gewebestücke handelte (ca. $5 \times 2 \times 0.3$ mm, <1 mg Trockengewicht) und das arterielle Gewebe ohnehin eine relativ geringe Stoffwechselaktivität zeigt (LEHNINGER, 1959), war es notwendig gewesen, eine Apparatur zu bauen, die es gestattete, den Sauerstoffpartialdruck in einem Inkubationsvolumen von einigen hundert Mikrolitern mit genügender Genauigkeit zu bestimmen.

Abb. 3 zeigt die von uns verwendete Meßkammer.

Das Inkubationsgefäß b bestand aus einem geschliffenen Glaszylinder, der in einem Plexiglasblock eingelassen war und mit thermostatisiertem Wasser c umspült wurde. In dem Zylinder konnte mit Hilfe von 4 Führungsstäben ein Stempel luftdicht bewegt werden. Durch Höhenverstellung des Stempels konnte das Inkubationsvolumen verändert und der Größe der zu untersuchenden Gewebeprobe angepaßt werden. In dem Stempel war die Sauerstoffelektrode a fest eingeschraubt. Die Länge des Stempels war so bemessen, daß in der tiefsten Stellung gerade noch ein Mikro-Magnetrührer e bewegt werden konnte.

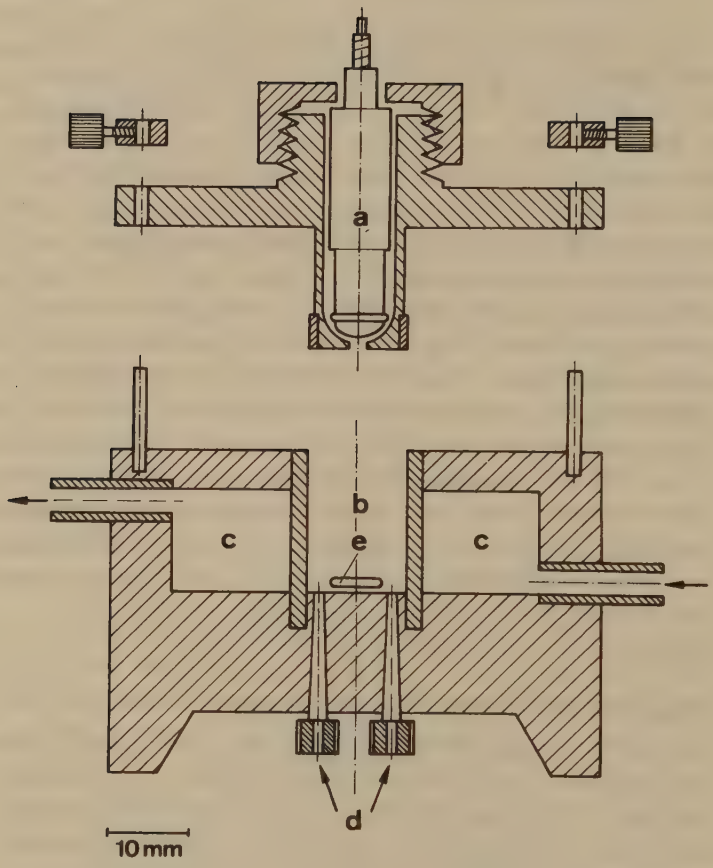

Abb. 3: Apparatur zur polarographischen Messung des Sauerstoffpartialdruckes in kleinen Inkubationsvolumina.

Über die zwei Einlaßöffnungen d am Boden des Gefäßes konnte die Meßkammer mit einer Kanüle beschickt werden. Durch genormte Unterlegscheiben an den seitlichen Führungsstiften war die Höheneinstellung des Stempels und damit das Inkubationsvolumen definiert. In jeder Stempelstellung wurde das Inkubationsvolumen mit Hilfe der Indikatorverdünnungsmethode bestimmt. Dazu injizierten wir 20 µl einer 2 mM NADH-Lösung in die Kammer, füllten mit Wasser auf und bestimmten nach kurzem Rühren die Extinktion der verdünnten Lösung, wobei wir für die Konzentrationsberechnung folgende Relation zugrunde legten:

$$E_{366}\ 1.000 \ \hat{=}\ 0.303 \text{ mM NADH}$$

Das kleinstmögliche Inkubationsvolumen der Kammer betrug 210 µl.

Als Sauerstoffelektrode benutzten wir eine, mit einer Teflonmembran bezogene, Platindrahtelektrode mit einem Drahtdurchmesser von 50 µm (Fa.Bachhofer, Reutlingen). Bei einer Polarisationsspannung von 0.7 V und einem Sauerstoffpartialdruck von 19.3 kPa (145 Torr) lag die Stromstärke bei ca. 4 nA. Die Basisstromstärke in 100% N_2 war weniger als 0.05 nA (KNEHR et al., 1980). Danach berechnete sich der Eigenverbrauch der Elektrode zu 0.5×10^{-12} mol O_2/min. Diese Größe konnte vernachlässigt werden bezüglich der Sauerstoffmenge, die bei Atmosphärendruck und 37° C in 210 µl Wasser gelöst ist (ca. 0.5×10^{-7} mol O_2). Eine Überschlagsrechnung zeigt, daß der Sauerstoffgehalt in der Kammer auf Grund des Eigenverbrauchs der Elektrode erst nach etwa 17 Stunden um 1% abgenommen haben würde.

Als Spannungsgeber und Ampèremeter verwendeten wir ein kombiniertes Gerät, das von einer Münchner Arbeitsgruppe neu entwickelt worden war und ebenfalls von

der Fa. Bachhofer vertrieben wird (Modell 410). Der Kompensationsverstärker arbeitete extrem rauscharm und machte eine zusätzliche Abschirmung der Meßkammer unnötig.

Eine nicht unerhebliche Schwierigkeit bei der Messung von Sauerstoffpartialdrücken in kleinen Volumina stellt die Verunreinigung durch Mikroorganismen dar. Bei einem ungestörten Bakterienwachstum in den verwendeten Lösungen oder in der Meßkammer selbst kann es zu einem deutlichen Abfall des Sauerstoffpartialdruckes während der Messung kommen (GLÜCK und PAUL, 1977). Wir begegneten diesem Problem dadurch, daß wir die verwendeten Lösungen erst unmittelbar vor dem Gebrauch aus bidestilliertem Wasser ansetzten und zusätzlich 100 mg/l Penicillin und 300 mg/l Streptomycin zusetzten. Auf diese Weise konnten wir in der Regel über Stunden konstante Leerkurven registrieren und eine Verfälschung der Sauerstoffverbrauchswerte durch bakterielle Oxidation vermeiden.

Ein weiteres Problem ist die Temperaturempfindlichkeit der Platinelektrode. Nach der Theorie (NERNST, 1904) ist der Diffusionsgrenzstrom im stationären Fall durch folgende Gleichung gegeben:

$$I_{gr} = \frac{F \times D \times q \times c_o}{d}$$

wobei F die Faraday-konstante, D den Diffusionskoeffizienten, q den Querschnitt der Elektrode, c_o die Konzentration des durchtrittsfähigen Teilchens in der Lösung (hier also Sauerstoff), d die Diffusionsschicht bedeutet und angenommen wird, daß D wegen eines großen Überschusses an Fremdelektrolyt als konzentrationsunabhängig zu betrachten ist.

Setzt man für den Diffusionskoeffizienten D den NERNST-EINSTEIN'schen Ausdruck ein

$$D = u \times k \times T$$

wobei u die Beweglichkeit des Teilchens, k die BOLTZMANN'sche Konstante und T die absolute Temperatur bedeutet, so sieht man, daß der Grenzstrom der absoluten Temperatur direkt proportional ist. Bei einer Erhöhung der Temperatur um 3° C müßte also die gemessene Stromstärke um ca. 1% zunehmen.

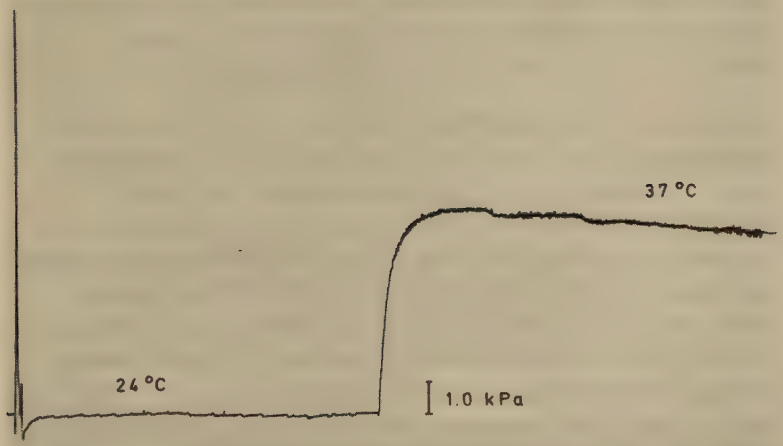

Abb. 4: Temperaturabhängigkeit des Diffusionsgrenzstromes der Platinelektrode. Die Empfindlichkeit ist so gewählt, daß 1 cm auf dem Schreiberpapier einer Änderung des Sauerstoffpartialdruckes um 1 kPa entspricht bzw. einer Änderung des Diffusionsgrenzstromes um ca. 0.2 nA.

In Abb. 4 ist der Verlauf des Diffusionsgrenzstromes der Platinelektrode in Abhängigkeit von der Temperatur wiedergegeben. Man sieht, daß sich die Stromstärke in weit stärkerem Maße ändert, als es die Theorie verlangt. Es war daher notwendig, absolut temperaturkonstant zu arbeiten und bei einem Austausch der Inkubationslösung während des Versuches, nur exakt gleich temperierte Lösungen zu verwenden. Da wir in einem Versuch häufig mehrere Inkubationslösungen verwenden mußten, haben wir eine Reihe von Äquilibriergefäßen mit einem Volumen von ca. 30 ml direkt hinter die Meßkammer in das gleiche Thermostatisiersystem geschaltet. Auf diese Weise konnten die einzelnen Lösungen bis auf $\pm$ 0.1° C thermokonstant gehalten werden. Das Entleeren und Beschicken der Meßkammer erfolgte mit einer herkömmlichen Einmalspritze und gelang nach einiger Übung in weniger als 10 Sekunden.

Nach dem Beziehen der Elektrode mit einer neuen Teflonmembran war es in der Regel notwendig, die Elektrode eine Stunde bei -0.7 V zu polarisieren, bis die Chlorierung des Silberringes, der als Gegenelektrode diente, abgeschlossen war und ein konstanter Diffusionsgrenzstrom gemessen werden konnte. Vor jedem Versuch wurde die Elektrode in 37°C temperierten Tyrodelösungen, die mit 21% Sauerstoff und 0% Sauerstoff äquilibriert waren, geeicht. Dann wurde die Elektrode in die Meßkammer eingesetzt und mit der jeweiligen Inkubationslösung eine Leerkurve registriert. Erst danach wurde die Gewebeprobe in die Kammer gegeben, mit neuer Inkubationslösung aufgefüllt und der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes gemessen. Im Anschluß daran wurde häufig zur Kontrolle eine zweite Leerkurve registriert.

In Abb. 5 ist eine Originalkurve wiedergegeben, die den Abfall des Sauerstoffpartialdruckes in der Kammer zeigt bei der Inkubation eines Gefäßsegmentes in zwei

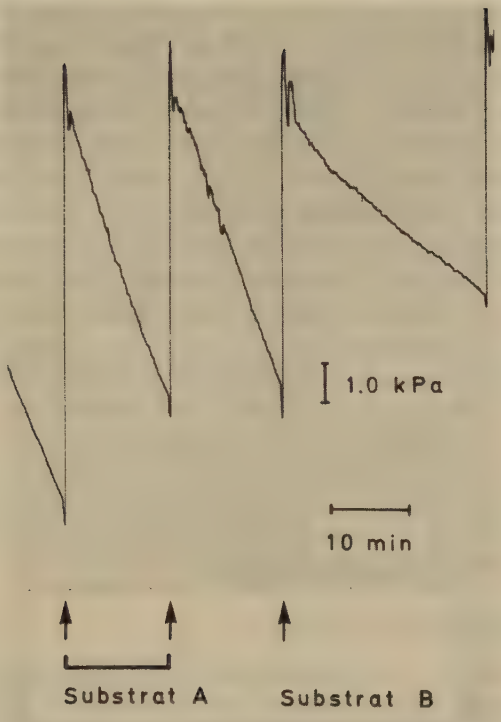

Abb. 5: Originalkurve des Sauerstoffdruckabfalls bei Inkubation eines Gefäßsegmentes in zwei verschiedenen Medien. An den mit Pfeilen markierten Punkten wurde die Kammer mit 21% O_2 äquilibrierter Inkubationslösung beschickt. Die Empfindlichkeit entspricht der in Abb.4.

verschiedenen Medien. Begonnen wurde die Messung stets in Tyrodelösung, die mit einem Gasgemisch von 21% O_2 äquilibriert war. Bei einem mittlerem Barometerdruck von 98.6 kPa (738 Torr) und einem Wasserdampfdruck von 6.3 kPa (47 Torr) entsprach dies einem Sauerstoffpartialdruck von 19.3 kPa (145 Torr) in der Lösung. Bei unseren Versuchen war der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes linear bis zu einem Druck von etwa 8 kPa (60 Torr). Gemessen wurde nur bis zu einem Sauerstoffpartialdruck von 13 kPa (97.5 Torr), um eine Diffusionslimitierung des Sauerstoffverbrauchs zu vermeiden und eine Hypoxie des Gewebes auszuschließen.

Für die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs wurde eine Löslichkeit von 0.0239 ml O_2/ml Lösung bei 101.3 kPa (760 Torr) und 37° C angenommen.

2.3. Biochemische Untersuchungen

2.3.1. Bestimmung von Lactat

Lactat wurde in der Inkubationslösung enzymatisch nach der Methode von GUTMANN und WAHLEFELD (1974) bestimmt. Danach wird Lactat in der von Lactat-Dehydrogenase, LDH (Lactate: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27) katalysierten Reaktion durch NAD zu Pyruvat oxidiert. Zur quantitativen Dehydrierung von Lactat müssen die Reaktionsprodukte aus dem Gleichgewicht entfernt werden; die Protonen werden durch ein alkalisches Reaktionsmedium, Pyruvat als Hydrazon abgefangen.

$$\text{Lactat} + \text{NAD}^+ + \text{Hydrazin} \xrightarrow[\text{pH } 9.0]{\text{LDH}} \text{Pyruvathydrazon} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Das entstehende NADH wird photometrisch bei $\lambda = 366$ nm bestimmt.

2.3.2. Bestimmung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Gewebe.

Der DNA-Gehalt des Gwebes wurde fluorimetrisch nach PUZAS und GOODMAN (1978) bestimmt. Zur Entfernung der Lipide, Glycolipide und Ganglioside wurden die gefriergetrockneten Gefäßsegmente in 0.01 M äthanolischer Kaliumacetat-Lsg. extrahiert, abzentrifugiert und der Rückstand 2 Stunden im Ölvakuum getrocknet. Danach wurde zu jeder Probe 100 µl 2 M 3,5-diaminobenzoesäure-dihydrochlorid-Lsg. gegeben und 30 min im Wasserbad bei 60° C inkubiert.

Zur Reduzierung der unspezifischen Fluoreszenz war die Aminobenzoesäure zuvor über Aktivkohle gereinigt worden.

Nach der Inkubation wurde 1 ml 0.6 N Perchlorsäure zugesetzt, gerührt, abzentrifugiert und die Fluoreszenz des Überstandes gemessen ($\lambda^{a}_{405} \longrightarrow \lambda^{e}_{490\ nm}$).

2.4. Histochemische Untersuchungen.

Die histochemischen Untersuchungen wurden im Laboratorium von Prof.Dr.K.Reutter am Anatomischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

2.4.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Monoamine.

Für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Monoamine wurde die von TORRE und SURGEON (1976) modifizierte Technik der Glyoxylsäure-Kondensationsreaktion verwendet. Zum Anfertigen der Kryoschnitte wurden die Gewebeproben in flüssigem Propan (-180°C) schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung

unter flüssigem Stickstoff (-196° C) aufbewahrt. Die frischen Kryoschnitte (16-20 um) wurden direkt für 3 sec in das Reaktionsmedium eingestellt (wässrige Lsg. von Saccharose 0.2 M, KH_2PO_4 0.236 M, Glyoxylsäuremonohydrat 1%, titriert mit 1 N NaOH auf pH 7.4), nach der Inkubation mit Hilfe eines Föns getrocknet und 5 min bei 80° C im Wärmeschrank inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit einem Tropfen Siliconöl und einem Deckglas bedeckt und die Objektträger für 1-2 min auf eine Wärmeplatte (80° C) gelegt. So konnten störende Luftblasen vertrieben werden, die sich beim Übertragen des Schnittes vom Kryostatenmesser auf den Objektträger stets unter dem Gewebsschnitt bildeten. (Die Luftbläschen leuchten im Fluoreszenzmikroskop auf und machen damit eine Untersuchung von Monoaminen unmöglich). Die luftfreien Präparate wurden direkt im Anschluß an ihre Herstellung fluoreszenzmikroskopisch untersucht ($\lambda^a_{366} \longrightarrow \lambda^e_{480\ nm}$). Die induzierte Monoaminfluoreszenz erwies sich als relativ stabil (ca. 30 min).

2.4.2. Histochemischer Nachweis der Aktivität von Succinat-Dehydrogenase (SDH).

2.4.3. Histochemischer Nachweis der Aktivität von Lactat-Dehydrogenase (LDH).

SDH (Succinat: Oxidoreduktase, EC 1.3.99.1) und LDH (Lactat: NAD-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.27) sind substratspezifische Dehydrogenasen, die von Succinat bzw. Lactat Wasserstoff abspalten und auf ein Acceptormolekül übertragen. Im histochemischen Nachweis verwendet man als Wasserstoffacceptor Tetrazoliumsalze, die im oxidiertem Zustand als farblose Verbindungen vorliegen, nach Aufnahme von Wasserstoff als gefärbtes

Pigment sichtbar werden. In dem von uns eingesetzten Nachweisverfahren zur Darstellung einer SDH-Aktivität (GOEBEL und PUCHTLER, 1955) und einer LDH-Aktivität (NACHLASS et al.,1958) wurde Tetranitroblautetrazoliumchlorid verwendet: 20 µm Kryoschnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht und 20 min bei 37° C in der jeweiligen Reaktionslösung inkubiert. Danach wurde mit Phosphatpuffer bzw. Trismaleatpuffer gewaschen, in 4% Formalinlösung fixiert und über Äthanol-Stufen und über Xylol in DePeX eingeschlossen.

3. Ergebnisse

3.1. DNA-Gehalt der untersuchten Gewebeproben

In Tab. I ist der nach PUZAS und GOODMAN (1978) ermittelte DNA-Gehalt der untersuchten Gewebeproben wiedergegeben.

Tabelle I

DNA-Gehalt von Gewebeproben der gereizten und kontralateralen Arteria carotis communis des Kaninchens. (ug DNA/mg Trockengewicht; Mittelwerte ± S.D.,n= 12)

	Kontrolle	p	Proliferat
Gesamtwand	10.1 ± 1.1	0.05	11.4 ± 2.1
Intima-Media	11.2 ± 1.3	0.05	13.1 ± 1.6
Adventitia	8.1 ± 1.2		

Die Signifikanz der Differenzen zwischen Proliferat und Kontrolle wurde mit dem gepaarten t-Test nach Student ermittelt.

Verglichen mit dem DNA-Gehalt der kontralateralen Arterie des gleichen Tieres war der DNA-Gehalt der entsprechenden Präparate der gereizten Seite auf dem 5% Niveau signifikant erhöht. Dies entspricht der morphologisch beobachteten Akkumulation von glatten Muskelzellen in Intima und Media der gereizten Arterie. Die histologische Untersuchung der Proliferate zeigte, daß mit beginnender Plaqueentwicklung die Zellzahl pro Volumen Gewebe deutlich erhöht ist (BETZ und SCHLOTE, 1979; EITEL et al., 1980). Die höchste Zelldichte war im subendothelialen Raum und in der inneren Media zu beobachten. Der höhere DNA-Gehalt der Intima-Media Präparate verglichen mit dem der

Gesamtwandpräparate bestätigt auch diese Beobachtung. Auf eine Untersuchung der Adventitia bei den Proliferaten haben wir aus technischen Gründen verzichtet, da es sehr schwierig war, reproduzierbare Präparate zu erhalten: Nach 4-wöchiger Implantation der Elektrode war die Manschette völlig mit Bindegewebe umwachsen und die Abschälung der Adventitia in einem Stück gelang nur selten.

3.2. Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion der gereizten und kontralateralen Arteria carotis communis unter in vitro Inkubationsbedingungen.

3.2.1. Einfluß von exogenen Substraten.

In Tab. II und Abb. 6 sind die Werte des Sauerstoffverbrauchs der verwendeten Präparate bei in vitro Inkubation ohne jedes exogene Substrat und in 5 mM Glucose und 2 mM Pyruvat wiedergegeben. Eine signifikante Steigerung der Gewebeatmung konnte nur bei den Proliferaten mit Pyruvat erzielt werden. Der Zusatz von Glucose erhöhte den Sauerstoffverbrauch bei keinen der Präparate. Lediglich der allmähliche Abfall des Sauerstoffverbrauchs, der im Verlauf des Versuches bei allen Präparaten festzustellen war, wurde bei einer Inkubation ohne jedes exogene Substrat etwas beschleunigt. Inkubation mit ß-Hydroxybutyrat, Glutamin und n-Butyrylcarnitin, drei weiteren Substanzen, von denen angenommen werden konnte, daß sie die Barriere der Zellmembran passieren und verstoffwechselt werden könnten, erhöhte den Sauerstoffverbrauch ebenfalls bei keinem Präparat.

Bezogen auf den DNA-Gehalt des Gewebes war der Sauerstoffverbrauch der Intima-Media- und der Adventitiapräparate der Kontrollarterien etwa gleich und nahezu

Sauerstoffverbrauch der gereizten und kontralateralen Arteria carotis communis (Kaninchen) in µmol/h·g Feuchtgewicht (µmol/h·mg DNA)
(Mittelwerte ± S.D.)

	ohne Substrat (n=6)	p	Glucose (5mM) (n=14)	p	Pyruvat (2mM) (n=6)
Kontrolle (Intima-Media)	5.1 ± 1.0 (1.82 ± 0.35)	ns	5.6 ± 1.1 (2.03 ± 0.41)	ns	7.1 ± 1.3 (2.56 ± 0.45)
Kontrolle (Adventitia)	3.8 ± 0.9 (1.87 ± 0.45)	ns	3.9 ± 0.8 (1.93 ± 0.39	ns	5.1 ± 0.9 (2.51 ± 0.48)
Kontrolle (Gesamtwand)	9.5 ± 1.3 (3.96 ± 0.50)	ns	10.2 ± 1.3 (4.03 ± 0.51)	ns	13.6 ± 1.4 (5.38 ± 0.54)
Proliferat (Intima-Media)	10.9 ± 1.7 (3.33 ± 0.51	ns	11.3 ± 1.3 (3.45 ± 0.40)	0.05	15.9 ± 1.7 (4.86 ± 0.52)
Proliferat (Gesamtwand)	13.7 ± 1.8 (4.82 ± 0.61)	ns	14.6 ± 1.9 (5.12 ± 0.65)	0.05	20.9 ±2.0 (7.33 ± 0.71)

Die Signifikanz der Differenzen wurde mit dem t-Test nach Student ermittelt.

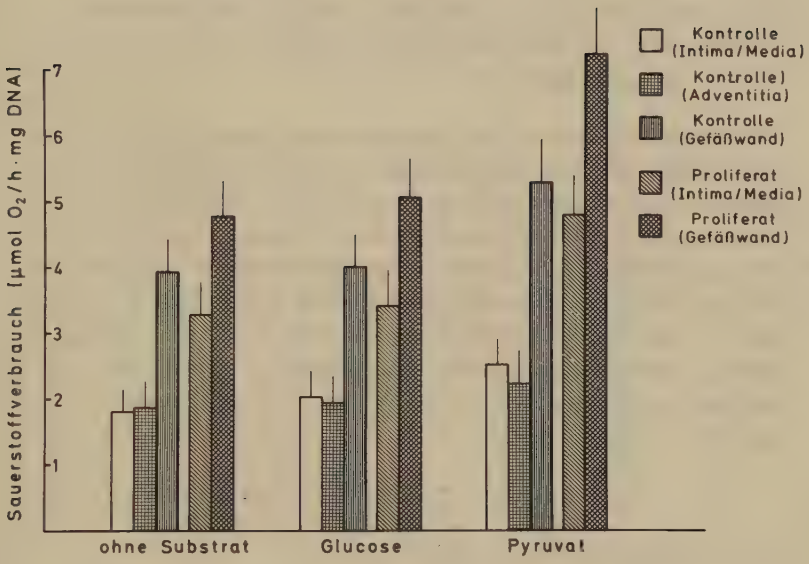

Abb. 6: Einfluß der exogenen Substratversorgung auf den Sauerstoffverbrauch der gereizten und kontralateralen Arteria carotis communis. Die Säulen entsprechen Mittelwerten ± S.D. Für die Anzahl der Versuche und Signifikanz der Differenzen siehe Tab. II.

halb so groß (53%) wie der der Gesamtwandpräparate. Bei den Proliferaten war der Unterschied im Sauerstoffverbrauch zwischen Intima-Media-Präparaten und Gesamtwandpräparaten nicht ganz so hoch, aber ebenfalls deutlich (75%). Im Vergleich zu den Kontrollarterien war der Sauerstoffverbrauch der Proliferate stets erhöht. Die Differenz der Werte zwischen entsprechenden Präparaten der gereizten und ungereizten Arterie war auf dem 1%-Niveau signifikannt (gepaarter t-Test nach Student).

Die Laktatproduktion der Gewebeproben wurde bei der Inkubation mit den verschiedenen exogenen Substraten ebenfalls nur unwesentlich beeinflußt. Im Gegensatz zu dem Sauerstoffverbrauch war die Laktatproduktion von Intima-Media-Präparaten und Gesamtwandpräparaten bei den Kontrollarterien etwa gleich groß (Tab.III, Abb.7). Bei den Proliferaten war die Laktatproduktion beider Präparate ebenfalls vergleichbar, gegenüber den Werten der Kontrollarterie jedoch signifikannt erhöht.

3.2.2. Stimulation mit Noradrenalin

Stimulation der Gewebeatmung mit einer supramaximalen Dosis von Noradrenalin (10 µM) erhöhte den Sauerstoffverbrauch der Gesamtwandpräparate bei den Kontrollarterien auf das 1.7-fache, während sich der Verbrauch der Intima-Media-Präparate praktisch nicht änderte (Tab. III, Abb. 7). Bei den Proliferaten erhöhte sich der Sauerstoffverbrauch bei beiden Präparaten nur etwa um 20-30%; die Differenz der Mittelwerte war nach dem gepaarten t-Test gleichwohl signifikant. Die Gesamtwandpräparate von Kontrollarterie und Proliferat zeigten unter dem stimulierenden Einfluß von Noradrenalin annähernd den gleichen Sauerstoffverbrauch.

Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion der gereizten und kontralateralen Arteria carotis communis (Kaninchen) unter dem Einfluß von exogenem Noradrenalin (25 µM) in µmol/h·g Feuchtgewicht (µmol/h·mg DNA)
(Mittelwerte ± S.D.)

		n	Sauerstoffverbrauch	Laktatproduktion
Kontrolle (Intima-Media)	ohne	14	5.6 ± 1.1 (2.03 ± 0.41)	6.5 ± 1.4 (2.32 ± 0.51)
	mit NA	6	6.2 ± 1.3 (2.24 ± 0.43)	6.7 ± 1.5 (2.38 ± 0.55)
Kontrolle (Gesamtwand)	ohne	14	10.2 ± 1.3 (4.03 ± 0.51)	6.4 ± 1.2 (2.55 ± 0.48)
	mit NA	6	17.3 ± 1.9 (6.86 ± 0.76)	9.0 ± 1.5 (3.55 ± 0.61)
Proliferat (Intima-Media)	ohne	14	11.3 ± 1.3 (3.45 ± 0.53)	11.2 ± 1.9 (3.44 ± 0.56)
	mit NA	6	14.1 ± 2.1 (4.31 ± 0.65)	12.4 ± 2.0 (3.78 ± 0.63)
Proliferat (Gesamtwand)	ohne	14	14.6 ± 1.9 (5.12 ± 0.65)	10.7 ± 2.0 (3.75 ± 0.71)
	mit NA	6	19.1 ± 2.3 (6.70 ± 0.81)	12.4 ± 1.9 (4.36 ± 0.66)

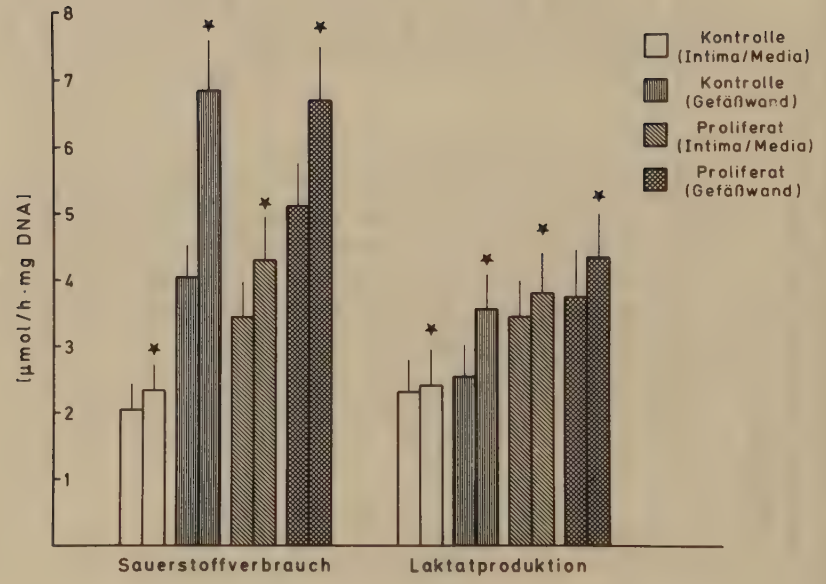

Abb. 7: Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion der gereizten und kontralateralen Arteria carotis communis unter dem Einfluß von exogenem Noradrenalin. Die mit Sternchen markierten Säulen entsprechen den Werten bei Inkubation in 25 µM Noradrenalin. (Tab.III)

Die Laktatproduktion wurde unter dem Einfluß von Noradrenalin bei den Kontrollarterien ebenfalls nur bei den Gesamtwandpräparaten deutlich erhöht (1.4-fach). Bei den Proliferaten war die Zunahme der Laktatproduktion in beiden Präparaten nicht signifikant.

3.2.3. Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung und Succinat-Stimulation.

In Tab. IV und Abb. 8 sind die Sauerstoffverbrauchswerte der Gewebeproben bei Inkubation mit Succinat und 2,4-Dinitrophenol (DNP) wiedergegeben. Inkubation mit 4×10^{-3} M Succinat erhöht den Sauerstoffverbrauch der Intima-Media-Präparate der Kontrollarterie auf das 8-fache, während sich die Atmung der Gesamtwandpräparate unter den gleichen Bedingungen nur etwa um 60% steigerte. Bei den Proliferaten stieg der Sauerstoffverbrauch der Intima-Media-Präparate auf das 2.6-fache; der Verbrauch der Gesamtwandpräparate nahm wie bei den Kontrollarterien etwa um die Hälfte zu.

In Ca^{2+}-freier Lösung wurde die durch Succinatgabe gesteigerte Gewebeatmung weitgehend aufgehoben.

Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung durch 2,4-Dinitrophenol bewirkte die stärkste Zunahme des Sauerstoffverbrauchs bei den Proliferaten (3.9-fach bei beiden Präparaten). Die Gesamtwandpräparate der Kontrollarterien steigerten ihre Atmung etwa in gleicher Höhe (3.7-fach), während die Intima-Media-Präparate nur eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs um das 2.4-fache zeigten.

Gleichzeitige Inkubation mit DNP und Succinat bewirkte bei allen Präparaten einen Sauerstoffverbrauch, der zwischen den Werten lag, die mit DNP und Succinat allein erhalten worden waren.

Tabelle IV

Sauerstoffverbrauch der gereizten und kontralateralen Arteria carotis communis (Kaninchen) bei Inkubation mit Succinat und 2,4-Dinitrophenol in µmol/h·g Feuchtgewicht (µmol/h·mg DNA)
(Mittelwerte ± S.D.)

	Glucose 5mM (n=14)	Succinat 4mM (n=8)	Succinat ohne Ca^{2+} (n=8)	DNP 0.1mM (n=8)	DNP + Succinat (n=8)
Kontrolle (Intima-Media)	5.6 ± 1.1 (2.03 ± 0.41)	45.6 ± 5.5** (16.76± 1.53)	15.1 ± 1.8** (5,47 ± 0.68)	14.0 ± 2.6** (5.10 ± 0.94)	31.8 ± 2.2** (11.3 ± 1.09)
Kontrolle (Gesamtwand)	10.2 ± 1.3 (4.03 ± 0.51)	16.4 ± 2.5* (6.83 ± 0.74)	11.4 ± 1.4ns (4.57 ± 0.58)	37.6 ± 3.4** (14.92± 1.41)	30.2 ± 2.7** (12.1 ± 0.95)
Proliferat (Intima-Media)	11.3 ± 1.3 (3.45 ± 0.53)	29.4 ± 3.4** (9.06 ± 1.03)	15.6 ± 1.7ns (4.80 ± 0.52)	43.7 ± 3.8** (13.4 ± 1.22)	34-3 ± 3.5** (10.56± 1.06)
Proliferat (Gesamtwand)	14.6 ± 1.9 (5.12 ± 0.65)	21.2 ± 2.3* (7.72 ± 0.82)	14.6 ± 2.3ns (5.32 ± 0.83)	57.2 ± 4.5** (20.o7± 1.68	34.8 ± 3.1** (12.67±1.13)

Die Signifikanz der Differenzen wurde mit dem t-Test nach Student ermittelt und sie beziehen sich auf die Werte in 5 mM Glucose: ns = nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

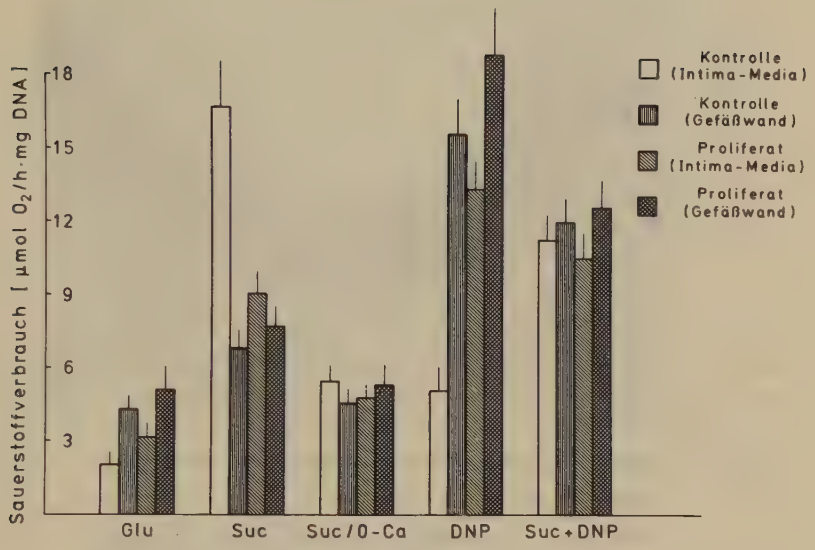

Abb. 8: Sauerstoffverbrauch der gereizten und kontralateralen Arteria carotis communis unter Succinat-Stimulation und Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung. Glu: Tyrode-Lsg. mit 5 mM Glucose; Suc: Tyrode-Lsg. mit 4 mM Succinat; Suc/0-Ca: Ca^{2+}-freie Tyrode-Lsg. mit 4 mM Succinat; DNP: Tyrode-Lsg. mit 0.1 mM 2,4-Dinitrophenol; Suc + DNP: Tyrode-Lsg. mit 4 mM Succinat + 0.1 mM 2,4-Dinitrophenol. (siehe Tabelle IV).

3.3. Histochemische Untersuchungen.

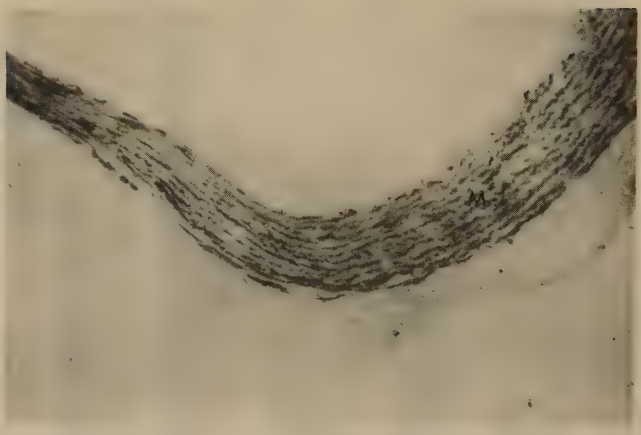

Abb. 9: Kontrollarterie mit Darstellung der LDH-Aktivität. Die Aktivität des Enzyms ist gleichförmig im Bereich der gesamten Tunica Media verteilt.

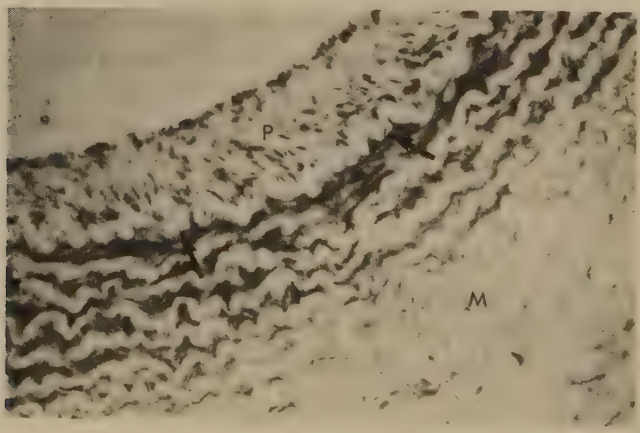

Abb.10: Ausschnitt der gereizten Gefäßwand mit Darstellung der LDH-Aktivität. Man erkennt eine Zunahme der der Enzymaktivität (dunklere Färbung) im inneren Drittel der Tunica Media M, unterhalb des subendothelialen Proliferates P. ➟ Membrana elastica interna.

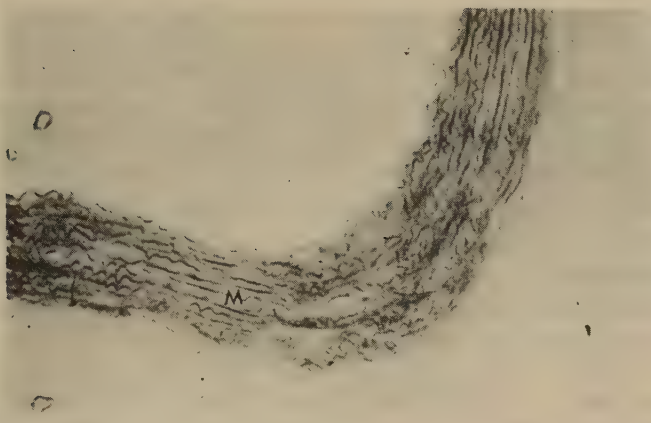

Abb.11: Kontrollarterie mit Darstellung der SDH-Aktivität. Die Aktivität des Enzyms ist gleichförmig im Bereich der gesamten Tunica Media verteilt.

Abb.12: Ausschnitt der gereizten Gefäßwand mit Darstellung der SDH-Aktivität. Deutliche Erhöhung der Enzymaktivität innerhalb einer schmalen Zone an der medialen Seite der Membrana elastica interna ⟶ sowie im Proliferat P selbst.

4. Diskussion

Mit der Methode der in vitro Inkubation werden Stoffwechselkapazitäten gemessen, die von den jeweils angewandten Versuchsbedingungen abhängig sind. Die Art des Inkubationsmediums, die Inkubationszeit und Inkubationstemperatur und nicht zuletzt die Präparationstechnik haben einen entscheidenden Einfluß auf die Gewebeatmung, so daß ein Rückschluß von den gemessenen Absolutwerten auf die Stoffwechselaktivität des Gewebes in vivo nur bedingt möglich ist.

In Tab. V sind einige Werte, die der Literatur entnommen wurden, mit den jeweiligen Versuchsbedingungen angegeben. Die Einheit ist µmol/h·g Feuchtgewicht. Bei unseren Versuchen war die Relation Feuchtgewicht/Trockengewicht im Durchschnitt 1 : 0.25 .

Tabelle V

Sauerstoffverbrauch I_{O_2} und Lactatproduktion I_{Lac} (µmol/h·g Feuchtgewicht)

	I_{O_2}	I_{Lac}
A.carotis (Schwein) (27) Präparat: Intima-Media Methode: polarographisch Inkubationslsg.: Tyrode 5%CO_2/Luft Substrat: Glucose 10 mM Präparation/Präinkubation 4° C Messung: 37° C	4.64	7.53
A.carotis (Katze) (88) Präparat: Glomus caroticum Methode: polarographisch Inkubationslsg.: Phosphatpuffer 100% O_2 Substrat: Succinat 17 mM Präparation/Präinkubation 23° C Messung: 23° C	13.66	

	I_{O_2}	I_{Lac}
Aorta (Schwein) (85) Präparat: Intima-Media Methode: polarographisch Inkubationslsg.: KRB 5%CO_2/Luft		
Substrat: Glucose 150 mM		
Präinkubation 4°C, Messung 37°C	1.20	5.51
Präinkubation 37°C, Messung 37°C	4.52	10.44
Substrat: keines		
Präinkubation 4°C, Messung 37°C	0.98	2.97
Präinkubation 37°C, Messung 37°C	4.18	1.74
Aorta (Kaninchen) (61) Präparat: Intima-Media Methode: polarographisch Substrat: Glucose 5 mM		
Inkubationslsg.: KRB 5%CO_2/Luft Präinkubation 4°C, Messung 37°C	5.75	5.22
Inkubationslsg.: KRB + 6% Albumin 5%CO_2/Luft Präinkubation 37°C, Messung 37°C	8.75	3.44
Aorta (Kaninchen) (87) Präparat: Gesamtwand Methode: Warburg-Kammer Inkubationslsg.: KRB 100% O_2 Substrat: Glucose 30 mM Präinkubation 37°C, Messung 37°C		
Kontrollarterie	2.34	5.00
Proliferat (Cholesterinfutter 1%, 18 Wochen)	5.13	5.40
Aorta (Kaninchen) (62) Präparat: Intima-Media Methode: Warburg-Kammer Inkubationslsg.: KRB 5%CO_2/Luft Substrat: Glucose 75 mM Präinkubation 37°C, Messung 37°C		
Kontrollarterie	4.27	3.40
Proliferat (Cholesterinfutter 2%, 16 Wochen)	7.34	9.09

	I_{O_2}
Aorta (Kaninchen) (16) Präparat: Gesamtwand Methode: polarographisch Inkubationslsg.: KRB 5%CO_2/Luft Präinkubation 37°C, Messung 37°C	
Substrat : Glucose 5 mM, Aminosäuren	5.67
Substrat : keines	8.66
Aorta (Kaninchen) (40) Präparat: Gesamtwand Methode: Mikroelektrode/O_2-Druckprofil Inkubationslsg.: Krebs-Ringer, pH 7.4 Substrat: Glucose ?mM Präparation 39°C, Messung 39°C	10.8
A.femoralis (Kaninchen) (18) Präparat: in vivo Methode: Mikroelektrode/O_2-Druckprofil	15.9

Aus der Tabelle kann man entnehmen, daß der Sauerstoffverbrauch abnimmt, wenn das Präparat während der Präparation unter 37° C abgekühlt worden ist (SCOTT et al.,1970), wenn bei der Präparation die Intaktheit einzelner Gewebeschichten zerstört worden ist (MORRISON et al., 1976), oder wenn unphysiologische Inkubationslösungen verwendet worden sind (STANGE und PAPENBERG, 1978). Die höchsten Werte ergeben sich aus Sauerstoffprofilmessungen mit Mikroelektroden am gesamten Gefäß (JURRUS und WEISS, 1977; CRAWFORD et al., 1980), wobei hierbei allerdings theoretische Annahmen über die Löslichkeit und über die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs in die Berechnung mit eingehen. Bei der Lactatproduktion scheint es sich eher umgekehrt zu verhalten. Lange Inkubationszeit (GLÜCK und PAUL, 1977), Abkühlung

des Präparates (SCOTT et al.,1970) und Verletzung der Intima (MORRISON et al., 1976) erhöhen die Lactatproduktion. Außerdem spielt hier die exogene Glucoseversorgung eine größere Rolle (SCOTT et al., 1970). Der oxidative Metabolismus der Myocyten reagiert demnach auf exogene Noxen empfindlicher als die Glycolyse, die sogar reaktiv gesteigert sein kann, um den Energiebedarf der Zelle zu decken. Ein hoher Sauerstoffverbrauch bei relativ niedriger Lactatproduktion spricht somit für eine physiologische Intaktheit des Gewebes und scheint die in vivo Aktivität besser widerzuspiegeln als gleich hohe Werte von Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion.

Der Sauerstoffverbrauch, den wir an Gesamtwandpräparaten der Arteria carotis communis des Kaninchens gemessen haben in carbonatgepufferter Tyrodelösung bei 37°C und physiologischer Glucose- und Sauerstoffversorgung, liegt im oberen Bereich der publizierten Werte für arterielles Gewebe. Das molare Verhältnis von Sauerstoffverbrauch und Lactatproduktion von 1.6 weist auf eine morphologische und funktionelle Intaktheit der von uns eingesetzten Präparate hin.

Die Proliferate zeigten unter den angewandten Inkubationsbedingungen im Vergleich zu den Kontrollarterien stets einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und eine gesteigerte Laktatproduktion. Der Vergleich zweier morphologisch unterschiedlich aufgebauter Gewebeproben hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität ist problematisch. Histologische Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß über 90% der Zellen in den Plaques, die durch elektrische Stimulation der Gefäßwand entstanden sind, als glatte Muskelzellen charakterisiert werden können (EITEL et al., 1980). Ein Vergleich der metabolischen Parameter, bezogen auf den DNA-Gehalt des Gewebes, rechtfertigt somit die Schlußfolgerung,

daß die respiratorische und glycolytische Kapazität dieser modifizierten Myocyten erhöht ist.

In Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen haben wir gefunden, daß durch exogener Substratzufuhr der Sauerstoffverbrauch des arteriellen Gewebes in vitro nur unwesentlich gesteigert werden kann (SCOTT et al., 1970). CHACE und ODESSEY (1981) fanden bei der Kaninchenaorta sogar eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs nach Inkubation ohne Substrat und interpretierten die Beobachtung als eine Kompensation des Mangels an glycolytisch gewonnenen ATP durch gesteigerte Oxidation von endogenen Substraten. Glucose, ß-Hydroxybutyrat, Glutamin oder n-Butyrylcarnitin, als exogenes Substrat zugesetzt, erhöhten den Sauerstoffverbrauch bei unseren Versuchen weder in den Proliferaten noch in den Kontrollarterien. Dies weist darauf hin, daß die glatten Muskel zellen in beiden Präparaten mit genügend endogenem Substrat ausgestattet sind, um den Ruhestoffwechsel aufrechtzuerhalten. Die signifikannte Zunahme des Sauerstoffverbrauchs bei Zugabe von Pyruvat zeigt andererseits, daß zumindest in den Proliferaten die Enzyme des Citratcyclus nicht ihre maximale Kapazität unter Ruhebedingungen erreicht haben, und daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in vorgelagerten Schritten der Substratdegradation, z.B. der Glycolyse, angenommen werden muß.

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob die erhöhte Gewebeatmung der Proliferate auf eine teilweise Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung in den modifizierten Myocyten zurückzuführen ist, haben wir die Gewebeproben mit einer supramaximalen Dosis von 2,4-Dinitrophenol (DNP) inkubiert und den Sauerstoffverbrauch gemessen. Die annähernd 4-fache Steigerung des Sauerstoffverbrauchs bei den Intima-Media-Präparaten und Gesamtwandpräparaten der Proliferate zeigt,

daß die Mitochondrien in den modifizierten Myocyten unter Ruhebedingungen gut gekoppelt sind (MORRISON et al., 1973). Der Sauerstoffverbrauch der Gesamtwandpräparate der Kontrollarterien ließ sich unter den gleichen Versuchsbedingungen geringfügig weniger, bis auf das 3.7-fache der Ruheatmung, steigern. Auch unter entkoppelten Bedingungen ist demnach die Kapazität des mitochondrialen Elektronentransportes und der Reduktionsäquivalente anliefernden Reaktionen in den proliferierten Myocyten größer als in den glatten Muskelzellen der Kontrollarterien.

Im Gegensatz zu CHACE und ODESSEY (1981), die vergleichbare Sauerstoffverbrauchswerte an Gefäßwandringen und Intima-Media-Streifen der Rattenaorta gefunden hatten, war bei unseren Untersuchungen der Sauerstoffverbrauch der Carotiswand etwa doppelt so groß wie der Verbrauch der Intima-Media-Präparate. Bei den Proliferaten war der Unterschied in beiden Präparationen geringer, aber ebenfalls vorhanden.

Wie schon im methodischen Teil ausgeführt wurde, ist mit besonderer Sorgfalt darauf geachtet worden, daß während der Präparation die Tunica Media nicht verletzt wurde. Nach einiger Übung gelang die stumpfe Präparation der Adventitia rasch und mühelos, ohne die Tunica Media mit der Präparierschere zu berühren. Eine mechanische Läsion der Mediamyocyten ist deshalb weitgehend auszuschließen. Die Adventitia konnte dagegen nicht in gleicher Weise geschont werden. Im Verlauf der Präparation mußten Teile der Adventitia wiederholt mit der Pinzette gefaßt werden, was eine Traumatisierung der Zellen wahrscheinlich machte. Bezogen auf den DNA-Gehalt des Gewebes zeigte die Adventitia gleichwohl etwa den gleichen Sauerstoffverbrauch wie die Intima-Media-Präparate.

Die nahezu doppelt so hohe Sauerstoffaufnahme der gesamten Arterienwand war gebunden an einer unversehrten Verbindung zwischen Tunica Media und Tunica Adventitia. Wir nehmen an, daß durch die Zerstörung des sympathischen Nervenplexus bei der Abpräparation der Adventitia die Stoffwechselaktivität der glatten Muskelzellen verringert wird.

Die adrenerge Innervation der Blutgefäße wird im allgemeinen durch zwei Plexus postganglionärer Neurone gewährleistet, die das Gefäß netzartig umgeben (BURNSTOCK und COSTA, 1975). Der äußere, primäre Plexus liegt im mittleren bis äußeren Drittel der Adventitia, der innere oder Grundplexus ist typischerweise auf die adventitio-mediale Grenzschicht beschränkt. Es wird angenommen, daß Transmitter, die von diesem Nervenplexus abgegeben werden, den Tonus der Gefäßmuskulatur variieren.
Die vollständige Präparation der Tunica Adventitia zerstört zwangsläufig diesen Plexus und befreit die Mediamyocyten von den stimulierenden Einfluß der Neurotransmitter. Die damit verbundene Tonusabnahme läßt sich bei der Präparation deutlich demonstrieren:
Ein intaktes Gefäßsegment, das sich gerade bündig auf die Präparierachse aufziehen läßt, vergrößert seinen Lumendurchmesser nach Abpräparation der Adventitia auf etwa das 1.5-fache, so daß der Intima-Media-Zylinder nach der Präparation nur noch lose um die Präparierachse hängt. Die Myocyten der Intima-Media-Präparate und der Gesamtwandpräparate befinden sich demnach in einem unterschiedlichen Kontraktionszustand; eine unterschiedliche Sauerstoffaufnahme wäre schon aus diesem Grunde plausibel (GLÜCK und PAUL, 1977; PAUL und PETERSON, 1975).

Um den Einfluß von Neurotransmittern auf den Metabolismus der Gefäßmuskulatur zu untersuchen, haben wir

die Präparate mit einer supramaximalen Konzentration von Noradrenalin (25 uM) inkubiert und den Sauerstoffverbrauch und die Laktatproduktion gemessen. Überraschenderweise konnten beide Stoffwechselparameter nur bei den Gesamtwandpräparaten deutlich gesteigert werden. Obgleich sich die Intima-Media-Präparate kontrahierten, wie in parallelen Versuchen gezeigt werden konnte (KNEHR und BETZ, 1983), erhöhte sich der Sauerstoffverbrauch und die Laktatproduktion nur unwesentlich. Ein unterschiedlicher Kontraktionszustand der Myocyten kann demnach nicht allein die Ursache für die deutlich reduzierte Stoffwechselaktivität der Intima-Media-Präparate sein.

Von der Skelettmuskulatur ist bekannt, daß die Innervation einen trophischen Effekt auf die Entwicklung, Differenzierung und Erhaltung der Struktur der Muskelzellen hat (GUTMAN,1964; GUTH,1968). Sie beeinflußt den Zellmetabolismus entscheidend durch Stimulation der Proteinsynthese und erhöhte Substratdegradation (LUCO und LUCO,1971).
Über die glatte Muskulatur gibt es weniger Berichte, die einen möglichen trophischen Effekt adrenerger Neurone auf die Muskulatur beschreiben. Dies mag z.T. daran liegen, daß weder die chirurgische, immunologische noch chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin eine völlige Zerstörung der adrenergen Endigungen in den Blutgefäßen bewirkt und die Reinnervation relativ frühzeitig einsetzt (FINCK et al.,1973; LEVI'MONTALANI und ANGELETTI, 1966; FINCK und LEACH, 1970). Gleichwohl konnte auch hier gezeigt werden, daß bei chronischer Sympathektomie der Einbau von ^{3}H-Thymidin erniedrigt ist (BEVAN, 1975) und die Gefäßwandmyocyten funktionell und strukturell verändert werden (BEVAN und TSURU, 1979). An der Portalvene und Vas deferens der Ratte ist gezeigt worden, daß

adrenerge Denervation Permeabilitätsveränderungen der Zellmembran verursachen können, die zu einer teilweisen Depolarisation mit nachfolgenden Veränderungen in der metabolischen Aktivität der glatten Muskellzellen führen (FLEMING, 1976; APRIGLIANO und HERMSMEYER, 1976).

Die Zerstörung des inneren sympathischen Plexus an der adventitio-medialen Grenze bei der vollständigen Präparation der Adventitia könnte zu ähnlichen Veränderungen an der Membranpermeabilität der Mediamyocyten führen. Diese Vermutung wird unterstützt durch den hohen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs der Intima-Media-Präparate bei der Inkubation mit Succinat. Succinat stimuliert die Atmung isolierter Mitochondrien, kann aber die Zellmembran nicht, oder nur in geringem Maße passieren (HEMS et al.,1968). Bei einer gestörten Funktion der Zellmembran, vermag Succinat in die Zelle zu diffundieren und wird in den Mitochondrien zu Fumarat und Malat oxidiert, das von der Zelle wieder abgegeben wird (MAPES und HARRIS, 1975). Die Stimulierbarkeit der Gewebeatmung durch Succinat wurde deshalb auch als Parameter für die Vitalität der Zellen in Leber- und Herzzellpräparationen verwendet (LETKO, 1978; BAUR et al., 1975; PFAFF et al.,1980; JOLLY et al.,1979).

Die 8-fache Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs bei den Intima-Media-Präparaten im Vergleich zu dem 1.6-fachen Anstieg bei den Gesamtwandpräparaten der Kontrollgefäße nach Inkubation mit Succinat zeigt deutlich, daß durch die Abpräparation der Tunica Adventitia eine Veränderung der Zellmembranpermeabilität bewirkt worden sein muß. Diese Störung in der Funktion der Zellmembran ist auch erklärbar auf Grund veränderter osmotischer Verhältnisse im Interzellularraum der

Media nach vollständiger Entfernung der Adventitia. Ungeachtet der Ursache ist mit der Annahme einer veränderten Zellmembranpermeabilität der geringe Sauerstoffverbrauch der Intima-Media-Präparate, besonders auch nach Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung, leicht zu erklären: endogene Stoffwechselzwischenprodukte, Co-faktoren oder sogar Enzyme selbst könnten aus der Zelle diffundieren und die metabolische Kapazität der Zellen drastisch reduzieren.

In Übereinstimmung mit Befunden, die an Leberpräparaten und isolierten Hepatocyten erhoben worden sind (ROSSUM, 1969 a; KLEINEKE und STRATMAN, 1974), haben wir gefunden, daß die Oxidation von Succinat in Ca^{2+}-freiem Medium nicht möglich ist. Auf Grund dieser Ergebnisse wird heute postuliert, daß Succinat die Energie verbrauchende Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien stimuliert. Zusammen mit Malat, das durch Oxidation von Succinat entstanden ist, diffundiert Ca^{2+} wieder aus den Mitochondrien heraus. Durch cyclische Aufnahme von Ca^{2+} in Zusammenhang mit Succinat-Aufnahme und Malat-Abgabe wird die Energie verbraucht, die durch die Oxidation von Succinat gewonnen wurde (ROSSUM, 1969b; HASLAM und GRIFFITHS, 1968). Die Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung verringert die exogene Succinatoxidation (QUAGLIARIELLO und PALMIERI, 1968). Unsere Versuche haben darüberhinaus gezeigt, daß exogene Succinatoxidation in der Lage ist, die entkoppelte Oxidation von Glucose zu verringern, was auf einen kompetitiven Wettstreit der NADH- und Flavoprotein-gebundenen Substrate um die Enzyme der Atmungskette hinweist (KNEHR, 1981).

Im Gegensatz zu den Kontrollarterien fällt bei den Proliferaten auf, daß sich die Intima-Media-Präparate in Bezug auf die Stimulation mit Succinat und DNP ganz ähnlich verhalten wie Gesamtwandpräparate. Die

Membranpermeabilität der modifizierten Myocyten scheint sich beim Abpräparieren der Adventitia nicht so zu verändern, daß Succinat in größeren Mengen aufgenommen werden kann. Die hohe Stimulierbarkeit mit DNP zeigt auch, daß die Stoffwechselkapazität der Myocyten erhalten geblieben ist.

Über die Ursache können wir bisher nur Vermutungen anstellen. Eine mögliche Erklärung wäre die unterschiedliche Ausdehnung des sympathischen Plexus bei den gereizten Carotiden. Obgleich der innere sympathische Plexus bei den meisten Gefäßen auf die adventitiomediale Grenzschicht beschränkt ist, gibt es auch Gefäße, bei denen die Axone die Media durchdringen (BEVAN und PURDY, 1973) und in einigen Fällen sogar die Intima erreichen (PEGRAM et al.,1976). Bei derartigen Gefäßen würde die Entfernung der Adventitia den sympathischen Plexus nicht vollständig zerstören und die Intima-Media-Präparate müßten sich,sowohl in mechanischer als auch in metabolischer Hinsicht, ähnlich den Gesamtwandpräparaten verhalten.

Wir haben deshalb versucht an einigen Präparaten den sympathischen Plexus mit histochemischen Methoden darzustellen (FALCK et al.,1962; HEYMS, 1981; DE LA TORRE und SURGEON, 1976). Die erhöhte Monoaminfluoreszenz, die wir an der adventitio-medialen Grenze in den Proliferaten gefunden haben, spricht für eine Akkumulation von Katecholaminen, was ein Hinweis auf eine verstärkte Innervation sein kann. Auf Grund der starken Autofluoreszenz der elastischen Lamellen in der Tunica Media war es uns jedoch nicht möglich, nachzuweisen, ob Nervenfasern in die Media penetriert waren oder nicht.(KNEHR und BETZ, 1982).

Die Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen zum Nachweis einer möglicherweise erhöhten Stoffwechselkapazität der Proliferate lassen relativ genaue Aussagen zu: Über die Demonstration der Aktivitäten von Lactatdehydrogenase (LDH) und Succinatdehydrogenase (SDH) ist es möglich, die örtliche Verteilung der metabolischen Kapazitätsveränderungen innerhalb der verschiedenen Gefäßwandschichten anzugeben. Während in den Kontrollarterien die LDH- und SDH-Aktivität gleichmäßig über alle Schichten der Tunica Media verteilt ist, ist bei den Proliferaten die größte LDH-Aktivität im inneren Drittel der Media, die stäkste SDH-Aktivität in der Intima und an der medialen Seite der Elastica interna lokalisiert. Diese Befunde stimmen mit den Meßergebnissen von DOEBLER et al. (1982) an cholesterin-induzierten atheromatösen Läsionen der Aorta von Neuseeländer-Kaninchen weitgehend überein.

Da die Intima der Ort ist, an dem eine Reihe von Energie verbrauchenden Prozessen während der Entwicklung der Plaques abläuft (THOMAS et al., 1968; LOFLAND und CLARKSON, 1965), ist eine erhöhte SDH- und LDH-Aktivität zu erwarten als Ausdruck eines erhöhten Bedarfs an ATP. Die erhöhte SDH-Aktivität ohne gleichzeitig darstellbare LDH-Aktivitätserhöhung in den Proliferaten könnte ein Hinweis auf eine veränderte Substratdegradation sein. MORRISON et al. (1974) haben in der Tat eine erhöhte Rate der Fettoxidation bei der Entwicklung atheromatöser Läsionen in der Kaninchenaorta nachgewiesen. In diesem Zusammenhang wäre es interessant durch Messung des Sauerstoffverbrauchs und der CO_2-Produktion den Respiratorischen Quotienten (RQ) des Gewebes zu bestimmen, um abschätzen zu können, ob in den Proliferaten in erhöhtem Maße Fette metabolisiert werden.

Im inneren Drittel der Media, dicht unterhalb des subendothelialen Proliferates ist die LDH-Aktivität höher als in anderen Teilen der Gefäßwand. Dies spricht für eine Adaption des Stoffwechsels auf eine beginnende Unterversorgung mit Sauerstoff an dieser Stelle der Gefäßwand (JURRUS und WEISS, 1977). Durch experimentell erzeugte hypoxische Bedingungen können ganz ähnliche Befunde erhalten werden (BARTLEY et al.,1968). Es ist sicher kein Zufall, daß mit fortschreitender Plaqueentwicklung erste Nekrosen in diesem Bereich der Gefäßwand auftreten (SCHNEIDERMAN et al.,1974).

Über die Ursache der erhöhten Stoffwechselaktivität atheromatös veränderter Gefäße gibt es bisher nur Vermutungen. An der Aorta cholesterin-gefütterter Kaninchen ist gezeigt worden, daß eine signifikannte Korrelation besteht zwischen erhöhtem Gefäßwandmetabolismus und gesteigerter Cholesterinaufnahme in die Gefäßwand (JENSEN, 1978). Eine erhöhte endotheliale Permeabilität für Makromoleküle ist in der Tat als primärer Schritt in der Atherogenese angesehen worden (SCHWARTZ, 1978; ROSS und GLOMSET,1976; ROSS und HARKER,1976). Die erhöhte Stoffwechselaktivität wäre dann als Reaktion der Myocyten zu verstehen, die einströmenden Substrate zu verstoffwechseln, oder in Energie verbrauchenden Prozessen wieder in die Blutbahn zurückzubefördern. Untersuchungen, vor allem histologischer Art, sind wünschenswert, um diese Kausalkette zu beweisen und damit der Pathogenese der Atherosklerose näherzukommen.

5. Zusammenfassung

In experimentell erzeugten Intima-Media-Proliferaten der Arteria carotis communis des Kaninchens wurden der Sauerstoffverbrauch und die Laktatproduktion bestimmt durch in vitro Inkubation des Gewebes. Die Ergebnisse wurden ergänzt durch die histochemische Demonstration der Aktivität von Succinatdehydrogenase (SDH) und Laktatdehydrogenase (LDH).

In carbonat-gepufferter Tyrodelösung und mit physiologischer Sauerstoff- und Glucoseversorgung war der Sauerstoffverbrauch der Proliferate, bezogen auf den DNA-Gehalt des Gewebes, etwa 30%, die Laktatproduktion 50% höher als in der kontralateralen Kontrollarterie des gleichen Tieres. Durch die Zufuhr von exogenem Substrat (Glucose, ß-Hydroxybutyrat, Glutamin, n-Butyrylcarnitin) in verschiedenen Konzentrationen konnte der Sauerstoffverbrauch nicht signifikant gesteigert werden. In dieser Hinsicht bestand weder ein qualitativer noch quantitativer Unterschied zwischen den Proliferaten und dem Kontrollgewebe. Nur Pyruvat steigerte den Sauerstoffverbrauch in den Proliferaten signifikant.

Die Stimulation des Stoffwechsels durch Noradrenalin war bei den Proliferaten geringer als bei den Kontrollarterien. Durch Inkubation mit einer supramaximalen Dosis von Noradrenalin konnte der Sauerstoffverbrauch der Proliferate um 30%, die Laktatproduktion um 16% gesteigert werden. Die Kontrollgefäße zeigten unter den gleichen Versuchsbedingungen eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs um 60% und eine Steigerung der Laktatproduktion um 40%.

Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung durch Inkubation der Gewebeproben mit 2,4-Dinitrophenol steigerte die Gewebeatmung der Proliferate und der

Kontrollarterien (Gesamtwandpräparate) auf das annähern 4-fache. Dies spricht für die Annahme, daß die Mitochondrien unter physiologischen Bedingungen sowohl in den Proliferaten als auch im normalen arteriellen Gewebe gut gekoppelt sind und der erhöhte Sauerstoffverbrauch der Proliferate nicht auf eine partielle Entkoppelung gestörter Mitochondrien in den modifizierten Myocyten zurückzuführen ist.

Intima-Media-Präparate der Kontrollarterien zeigten etwa den halben Sauerstoffverbrauch wie Gesamtwandpräparate; durch Noradrenalin oder 2,4-Dinitrophenol wurde die Gewebeatmung nur geringfügig gesteigert. Wir nehmen an, daß diese deutliche Reduzierung der Stoffwechselkapazität auf eine veränderte Zellmembranpermeabilität der Mediamyocyten zurückzuführen ist, hervorgerufen durch osmotische Phänomene oder den fehlenden Einfluß von Neurotransmittern nach Entfernung der Adventitia und des sympathischen Nervenplexus. Die drastisch erhöhte Oxidation von exogenem Succinat durch die Intima-Media-Präparate bestätigen diese Annahme.

Bei den Intima-Media-Präparaten der Proliferate ist der reduzierte Energieumsatz und die Stimulierbarkeit mit Succinat wesentlich geringer ausgeprägt. Als mögliche Ursache wird diskutiert, daß die Ausdehnung des sympathischen Plexus bei den gereizten Carotiden anders ist als bei den normalen Gefäßen.

Durch die histochemische Demonstration der Aktivitäten von Lactatdehydrogenase (LDH) und Succinatdehydrogenase (SDH) war es möglich, die örtliche Verteilung der metabolischen Kapazitätsänderungen innerhalb der verschiedenen Gefäßwandschichten angeben zu können. Während in den Kontrollarterien die LDH- und SDH-Aktivität gleichmäßig über alle Schichten der Tunica

media verteilt ist, ist bei den Proliferaten die stärkste SDH-Aktivität in der Intima und an der medialen Seite der Elastica interna lokalisiert. Der Ort höchster LDH-Aktivität liegt im inneren Drittel der Media, dicht unterhalb des intimalen Zellkissens. Dies könnte ein Hinweis auf eine beginnende Sauerstoffunterversorgung in dieser Region der Gefäßwand sein. Es ist sicher kein Zufall, daß mit fortschreitender Plaqueentwicklung erste Nekrosen in diesem Bereich der Gefäßwand auftreten.

6. Literaturverzeichnis

1. ADAMS, C.W.M., BAYLISS, O.B.
The Relationship between Diffuse Intimal Thickening, Medial Enzym Failure and Intimal Lipid Deposition in Various Human Arteries.
J. Atheroscler. Res. 10, 327-339 (1969)

2. APRIGLIANO, O., HERMSMEYER, K.
In Vitro Denervation of the Portal Vein and Caudal Artery of the Rat.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 198, 568-577 (1976)

3. BARTLEY, W., CLEGG, E.J., BUTTER, V.M.
Enzyme Changes in Mice under Hypoxic Conditions
Biochem. J. 109, 48-58 (1968)

4. BAUMGÄRTL, H., GRUNEWALD, W., LÜBBERS, D.W.
Polarographic Determination of the Oxygen Partial Pressure Field by Pt-Microelectrodes Using the Oxygen Field in Front of a Pt-Microelectrode as a Model.
Pflügers Arch. 347, 49-61 (1974)

5. BAUMGÄRTL, H., LÜBBERS, D.W.
Platinum Needle Electrode for Polarographic Measurement of Oxygen and Hydrogen.
In: Oxygen Supply, Theoretical and Practical Aspects of Oxygen Supply and Microcirculation of Tissue; pp. 130-136, edt. by KESSLER, M., BRULEY, D.F., CLARK, L.C., LÜBBERS, D.W., SILVER, I.A., STRAUSS, I., München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg (1973).

6. BAUR, H., KASPEREK, S., PFAFF, E.
Criteria of Viability of Isolated Liver Cells.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 356, 827-838 (1975)

7. BENDITT, E.P.
Evidence for a Monoclonal Origin of Human Atherosclerotic Plaques and some Inplications.
Circulation 50, 650-652 (1974)

8. BETZ, E., SCHLOTE, W.
Response of Vessel Walls to Chronically Applied Electrical Stimuli.
Basic Res. Cardiol. 74, 10-20 (1979)

9. BEVAN, J.A., PURDY, R.E.
Variations in Adrenergic Innervation and Contractile Responses of the Rabbit Saphenous Artery.
Circulat. Res. 32, 746-751 (1973)

10. BEVAN, R.D.
Effect of Sympathetic Denervation on Smooth Muscle Cell Proliferation in the Growing Rabbit Ear Artery.
Circulat. Res. 37, 14-19 (1975)

11. BEVAN, R.D., TSURU, H.
Long-Term Denervation of Vascular Smooth Muscle Causes not only Functional but Structural Change.
Blood Vessels 16, 109-112 (1979)

12. BOATMAN, J.B., CARTER, S.D.
Hypoxia and the Arterial Surface. Changes in the Linear Folds of the Intima under Scanning Electron Microscopy.
Arch. Environ. Health 27, 360-363 (1973)

13. BONDJERS, G., KRAL, J.G., OLSSON, G.
HDL-Mediated Cholesterol Elimination from Human Arterial Tissue. Influence of Serum Cholesterol Levels.
Exp. molec. Path. 32, 23-31 (1980)

14. BURNSTOCK,G.
Innervation of Vascular Smooth Muscle: Histochemistry and Electron Microscopy.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.2, 7-20 (1975)

15. CAVALLERO, C., DI TONDO, U., MINGAZZINI, P.L., PESANDO, P.C., SPAGNOLI, L.G.

Cell Proliferation in the Atherosclerotic Lesions of Cholesterol-Fed Rabbits.

Atherosclerosis 17, 49-62 (1973)

16. CHACE, K.V., ODESSEY, R.

The Utilization by Rabbit Aorta of Carbohydrates, Fatty Acids, Ketone Bodies and Amino Acids as Substrates for Energy Production.

Circulat. Res. 48, 850-858 (1981)

17. ST. CLAIR, R.W.

Metabolism of the Arterial Wall and Atherosclerosis.

In: Atherosclerosis Reviews, Vol.1, edt. by PAOLETTI, R., GOTTO JR., A.M., pp. 61-117, New York: Raven Press (1976)

18. CRAWFORD, D.W., BACK,L.H., COLE, M.A.

In Vivo Oxygen Transport in the Normal Rabbit Femoral Arterial Wall.

J. clin. Invest. 65, 1498-1508 (1980)

19. MC CULLAGH, K.G., EHRHART, L.A.

Increased Arterial Collagen Synthesis in Experimental Canine Atherosclerosis.

Atherosclerosis 19, 13-28 (1974)

20. DOEBLER, J.A., ANTHONY, A., BOCAN, T.M.A., HOLLIS, T.M.

Focal Alterations in Metabolic Capabilities Associated with Development of Cholesterol-Induced Atheromatous Lesions: A Quantitative Cytochemical Study.

Exp. molec. Path. 36, 227-241 (1982)

21. EITEL, W., SCHMID, G., SCHLOTE, W., BETZ, E.

Early Arteriosclerotic Changes of the Carotid Artery Wall Induced by Electrostimulation. A Study by Scanning and Transmission Electron Microscopy.

Path. Res. Pract. 170, 211-229 (1980)

22. FALCK, B., HILLARP, N.-A., THIEME, G., TORP, A.
Fluorescence of Catecholamines and Related Compounds Condensed with Formaldehyde.
J. Histochem. Cytochem. 10, 348-354 (1962)

23. FINCH, L., HAEUSLER, G., KUHN, H., THOENEN, H.
Rapid Recovery of Vascular Adrenergic Nerves in the Rat after Chemical Sympathectomy with 6-Hydroxydopamine.
Brit. J. Pharmacol. 48, 59-72 (1973)

24. FINCH, L., LEACH, G.D.H.
A Comparison of the Effects of 6-Hydroxydopamine, Immunosympathectomy and Reserpine on the Cardiovascular Reactivity in the Rat.
J. Pharm. Pharmac. 22, 354-360 (1970)

25. FLEMING, W.W.
Variable Sensitivity of Excitable Cells: Possible Mechanisms and Biological Significance.
In: Reviews of Neuroscience; edt. by EHRENPREIS, S., KOPIN, I.J., pp. 43-90, Vol.2, New York: Raven Press (1976)

26. GAINER, J.L., CHISOLM, G.M.
Oxygen Diffusion and Atherosclerosis.
Atherosclerosis, 19, 135-138 (1974)

27. GLÜCK, E., PAUL, R.
The Aerobic Metabolism of Porcine Carotid Artery and its Relationship to Isometric Force.
Pflügers Arch. 370, 9-18 (1977)

28. GOEBEL, A., PUCHTLER, H.
Untersuchungen zur Methodik der Darstellung der Succinatdehydrogenase im histologischen Schnitt.
Virchow's Arch. path. Anat. 326, 312-331 (1955)

29. GULD, CHR.
A Glass-covered Pt-Microelectrode.
Med. Electron. biol. Engng. 2, 317-327 (1964)

30. GUTH, L.
Trophic Influences of Nerve on Muscle.
Physiol. Rev. 48, 645-687 (1968)

31. GUTMAN, E.
Neurogenic Relations in the Regeneration Process.
Brain Res. 13, 72-112 (1974)

32. GUTMANN, J., WAHLEFELD, A.W.
Lactat: Bestimmung mit Lactatdehydrogenase und NAD.
In: Methoden der enzymatischen Analyse; etd. by BERGMEYER, H.U., 3.Auflage, 2.Band, pp.1510-1514, Weinheim: Verlag Chemie (1974)

33. HASLAM, J.M., GRIFFITHS, D.E.
Factors Affecting the Translocation of Oxaloacetate and L-Malate into Rat Liver Mitochondria.
Biochem. J. 109, 921-928 (1968)

34. HELIN, P., LORENZEN, I.
Arteriosclerosis in Rabbit Aorta Induced by Systemic Hypoxia.
Angiology 20, 1-12 (1969)

35. HEMS, R., STUBBS, M., KREBS, H.A.
Restricted Permeability of Rat Liver for Glutamate and Succinate.
Biochem. J. 107, 807-815 (1968)

36. HEUGHAN, C., NIINIKOSHI, J., HUNT, T.K.
Oxygen Tension in Lesions of Experimental Atherosclerosis of Rabbits.
Atherosclerosis, 17, 361-367 (1973)

37. HEYM, CHR.
Fluorescence Histochemistry of Biogenic Monoamines.
In: Techniques in Neuroanatomical Research; edt. by HEYM, CHR., FORSSMANN, W.G., pp. 139-170, Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag (1981)

38. JENSEN, J.
On the Relationship between Metabolic Activity and Cholesterol Uptake by Intima-Media of the Rabbit Aorta.
Biochim. Biophys. Acta 183, 204-214 (1969)

39. JOLLY, W.W., WILHELM, D.D., HARRIS, R.A.
Assessment of Tissue and Cell Damage by Succinate Oxidation.
J. Mol. Cell. Card. 11, 485-500 (1979)

40. JURRUS, E.R., WEISS, H.S.
In Vitro Oxygen Tensions in the Rabbit Aortic Arch.
Atherosclerosis 28, 223-232 (1977)

41. KARNOVSKY, M.J., ROOTS, L.
A Directcoloring Thiocholine Technique for Cholinesterases.
J. Histochem. Cytochem. 12, 219-230 (1964)

42. KIRK, J.E., LAURSEN, T.J.S.
Diffusion Coefficients of Various Solutes for Human Aortic Tissue. With Special Reference to Variation in Tissue Permeability with Age.
J. Gerontol. 10, 288-302 (1955)

43. KJELDSEN, K., ASTRUP, P., WANSTRUP, J.
Reversal of Rabbit Atheromatosis by Hyperoxia.
J. Atheroscler. Res. 10, 173-178 (1969)

44. KJELDSEN, K., THOMSEN, H.K.
The Effect of Hypoxia on the Fine Structure of the Aortic Intima in Rabbits.
Lab. Invest. 33, 533-543 (1975)

45. KJELDSEN, K., WANSTRUP, J., ASTRUP, P.

J. Atheroscler. Res. 8, 835-845 (1968)

46. KLEINEKE, J., STRATMAN, F.W.
Calcium Transport in Isolated Rat Hepatocytes.
FEBS Letters 43, 75-80 (1974)

47. KNEHR, H.E.
On the Oxygen Consumption of Intact Vessel Wall Segments and Intima-Media Preparations of the Rabbit Carotid Artery.
FEBS Letters 136, 138-140 (1981)

48. KNEHR, H.E., BETZ, E.
Metabolic Capacity and Cell Membrane Permeability of Smooth Muscle Cells in Atherosclerotic Plaques.
6th International Symposium on Atherosclerosis Berlin (1982)

49. KNEHR, H.E., BETZ, E.
Über die Wirkung von Benzaron auf den Sauerstoffverbrauch und die mechanische Aktivität der glatten Gefäßmuskulatur.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 33, 211-214 (1983)

50. KNEHR, H.E., HEINLE, H., BETZ, E.
Enhanced Oxygen Uptake and Lactate Production of Smooth Muscle Cell Proliferates of Rabbit Carotid Arteries.
Pflügers Arch. 387, 73-77 (1980)

51. KNEHR, H.E., LINKE, A.M.
NADH-Fluorescence and Spontaneous Activity of Rat Portal Veins at Decreased pH.
Resp. Physiol. 42, 145-154 (1980)

52. KNEHR, H.E., LINKE, A.M.
Changes in the Redox State of Pyridine Nucleotides in Relation to the Spontaneous Contractile Activity of Rat Portal Veins at Elevated pH.
Vasa 11, 4-8 (1982)

53. KOSAN, R.L., BURTON, A.C.
Oxygen Consumption of Arterial Smooth Muscle as a Function of Active Tone and Passive Stretch.
Circulat. Res. 18, 79-88 (1966)

54. LEHNINGER, A.L.
The Metabolism of the Arterial Wall.
In: The Arterial Wall; edt. by LANSING, A.J., pp. 220-246, Baltimore: Williams and Wilkins (1959)

55. LETKO, G.
A Quick Test for Intactness of Hepatocytes.
Acta Biol. Med. Germ. 37, 663-665 (1978)

56. LEVI-MONTALCINI, R., ANGELETTI, P.U.
Immunosympathectomy
Pharmacol. Rev. 18, 619-628 (1966)

57. LOFLAND, H.B., CLARKSON, T.B.
Certain Metabolic Patterns of Atheromatous Pigeon Aortas.
Arch. Pathol. 80, 291-296 (1965)

58. LUCO, C.F., LUCO, J.V.
Sympathetic Effects on Fibrillary Activity of Denervated Striated Muscles.
J. Neurophysiol. 34, 1066-1071 (1971)

59. MAIER, N., HAIMOVICI, H.
Oxidative Capacity of Atherosclerotic Tissue of Rabbit and Dog, with Special Reference to Succinic Dehydrogenase and Cytochrome Oxidase.
Circulat. Res. 16, 65-73 (1965)

60. MAPES, J.P., HARRIS, R.A.
On the Oxidation of Succinate by Parenchymal Cells Isolated from Rat Liver.
FEBS Letters 51, 80-83 (1975)

61. MORRISON, A.D., BERWICK, L., ORCI, L., WINEGRAD, A.I.
Morphology and Metabolism of an Aortic Intima-Media Preparation in which an Intact Endothelium is preserved.
J. Clin. Invest. 57, 650-660 (1976)

62. MORRISON, E.S., SCOTT, R.F., KROMS, M., FRICK, J.
Glucose Degradation in Normal and Atherosclerotic Aortic Intima-Media.
Atherosclerosis 16, 175-184 (1972)

63. MORRISON, E.S., SCOTT, R.F., KROMS, M., FRICK, J.
Aortic Mitochondrial Function in Experimentally Induced Atherosis in Swine and Rabbits.
Biochem. Med. 7, 308-315 (1973)

64. MORRISON, E.S., SCOTT, R.F., KROMS, M., FRICK, J.
Uptake, Oxidation and Esterification of Free Fatty Acids in Normal and Atherosclerotic Rabbit Aorta.
Biochem. Med. 11, 153-164 (1974)

65. MOSS, A.J., SAMUELSON, P., ANGELL, C., MINKEN, S.L.
Polarographic Evaluation of Transmural Oxygen Availability in Intact Muscular Arteries.
J. Atheroscler. Res. 8, 803-810 (1968)

66. MUNRO, A.F., RIFKIND, B.M., LIEBESCHEUTZ, H.J., CAMPBELL, R.S.F., HOWARD, B.R.
The Effect of Cholesterol Feeding on the Oxygen Consumption of Aortic Tissue from the Cockerel and the Rat.
J. Atheroscler. Res. 1, 296-306 (1961)

67. MURRAY, M., SCHRODT, G.R., BERG, H.F.
Mitochondrial Alterations in Human and Experimental Atherosclerosis.
Biochem. Med. 2, 118-135 (1968)

68. NACHLASS, M.M., WALKER, D.G., SELIGMAN, A.M.
A Histochemical Method for the Demonstration of Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase.
J. biophys. biochem. Cytol. 4, 29-38 (1958)

69. NERNST, W.
Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen.
Z. Physikal. Chem. 47, 52-55 (1904)

70. NIINIKOSHI, J., HEUGHAN, C., HUNT, T.K.
Oxygen Tensions in the Aortic Wall of Normal Rabbits.
Atherosclerosis 17, 353-359 (1973)

71. PAUL, R.J.
Chemical Energetics of Vascular Smooth Muscle.
In: Handbook of Physiology. Section 2: The Cardiovascular System. Volume II. Vascular Smooth Muscle; edt. by BOHR, D.F., SOLYO, A.P., SPARKS JR., H.V., pp. 201-235, Bethesda, Maryland (1980)

72. PAUL, R., PETERSON, J.
Relation between Length, Isometric Force and Oxygen Consumption Rate in Vascular Smooth Muscle.
Amer. J. Physiol. 228, 915-922 (1975)

73. PEGRAM, B.L., BEVAN, R.D., BEVAN, J.A.
Facial Vein of the Rabbit. Neurogenic Vasodilation Mediated by ß-Adrenergic Receptors.
Circulat. Res. 39, 854-860 (1976)

74. PFAFF, E., SCHULER, B., KRELL, H., HÖKE, H.
Viability Control and Special Properties of Isolated Rat Hepatocytes.
Arch. Toxicol. 44, 3-21 (1980)

75. PUZAS, J.E., GOODMAN, D.B.P.
A Rapid Assay for Cellular Desoxyribonucleic Acid
Anal. Biochem. 86, 50-55 (1978)

76. QUAGLIARIELLO, E., PALMIERI, F.
Control of Succinate Oxidation by Succinate-Uptake by Rat Liver Mitochondria.
European J. Biochem. 4, 20-27 (1968)

77. ROSS, R., GLOMSET, J.A.
The Pathogenesis of Atherosclerosis
New Engl. J. Med. 295, 369-377 (1976)

78. ROSS, R., HARKER, L.
Hyperlipidemia and Atherosclerosis
Science 193, 1094-1100 (1976)

79. ROSSUM VAN, G.D.V.
The Oxidation of Succinate and Permeability of Dicarboxylate Anions in Rat Liver Slices.
Arch. Biochem. Biophys. 133, 373-384 (1969a)

80. ROSSUM VAN, G.D.V.
The Inhibition of Active Movements of Na^+ and K^+ in Rat Liver Slices by High Concentrations of Succinate and Other Carboxylated Anions.
Arch. Biochem. Biophys. 133, 385-394 (1969b)

81. SCHLICHTER, J.G.
Vascularization of the Aorta in Different Species in Health and Disease.
Amer. Heart J. 35, 850-851 (1948)

82. SCHNEIDERMAN, G., GOLDSTICK, T.K., ZUCKERMAN, L.
Similarity between the Site of Minimum pO_2 and the Site of Initiation of Atherosclerosis?
Proc. Ann. Conf. Eng. Med. Biol. 16, 283 (1974)

83. SCHWARTZ, C.
Initial Events in Atherogenesis.
In: Very Early Recognition of Coronary Heart Disease; edt. by MC DONALD, L., GOODWIN, J., RESNEKOV, L., pp. 47-61, Amsterdam-Oxford: Excerpta Medica (1978)

84. SCOTT, R.F., MORRISON, E.S., KROMS, M.
Aortic Respiration and Glycolysis in the Pre-Proliferative Phase of Diet Induced Atherosclerosis in Swine.
J. Atheroscler. Res. 9, 5-16 (1969)

85. SCOTT, R.F., MORRISON, E.S., KROMS, M.
Effect of Cold Shock on Respiration and Glycolysis in Swine Arterial Tissue.
Am. J. Physiol. 219, 1363-1365 (1970)

86. SILVER, I.A.
Some Observations on the Cerebral Cortex with an Ultramicro, Membrane-covered Oxygen Electrode.
Med. Electron. Biol. Engng. 3, 377-387 (1965)

87. STANGE, E., PAPENBERG, J.
Changes in Chemical and Metabolic Properties of Rabbit Aorta by Dietary Cholesterol and Saturated and Polyunsaturated Fats.
Atherosclerosis 29, 467-476 (1978)

88. STARLINGER, H., LÜBBERS, D.W.
Oxygen Consumption of the Isolated Carotid Body Tissue (Cat).
Pflügers Arch. 366, 61-66 (1976)

89. STEHBENS, W.E.
Hemodynamics and Atherosclerosis.
Exp. Mol. Pathol. 20, 412-415 (1974)

90. STOUT, R.W.
Diabetes and Atherosclerosis. The Role of Insulin.
Diabetologia 16, 141-150 (1979)

91. TEXON, M.
Atherosclerosis. Its Hemodynamic Basis and Implications.
Med. Clin. N. Amer. 58, 257-268 (1974)

92. THOMAS, W.A., FLORENTIN, R.A., NAM, S.C., KIM, D.N., JONES, R.M., LEE, K.T.

Proliferative Phase of Atherosclerosis in Swine Fed Cholesterol.

Arch. Pathol. 86, 621-643 (1968)

93. TORRE DE LA, J.C., SURGEON, J.W.

A Methodological Approach to Rapid and Sensitive Monoamine Histofluorescence Using a Modified Glyoxylic Acid Technique: The SPG Method.

Histochemistry 49, 81-93 (1976)

94. URSCHEL, H.C., FINNEY, J.W., DYLL, L.M., BORLAND, G.L., RACE, G.J., JAY, B.E., DAVIS, E., BALLA, G.A.

Treatment of Arteriosclerotic Obstructive Cerebrovascular Disease with Hydrogen Peroxide.

Vasc. Surg. 1, 77-81 (1967)

95. VESSELINOVITCH, D., WISSLER, R.W., FISHER-DZOGA, K., HUGHES, R., DUBIEN, L.

Regression of Atherosclerosis in Rabbits. Part 1. Treatment with Low-Fat Diet, Hyperoxia and Hypolipidemic Agents.

Atherosclerosis 19, 259-275 (1974)

96. WEISS, H.S., WATSON, N.J., CALHOON, T.B.

Respiration of the Avian Aorta in Relation to Spontaneous Atherosclerosis.

Comp. Biochem. Physiol. 38A, 675-685 (1971)

97. WHALEN, W.J., NAIR, P.

PO_2 in the Carotid Body Perfused and Superfused with Cell-Free Media.

J. Appl. Physiol. 41, 180-184 (1976)

98. WHALEN, W.J., RILEY, J., NAIR, P.

A Microelectrode for Measuring Intracellular pO_2.

J. Appl. Physiol. 23, 798 (1967)

99. WHEREAT, A.F.

Oxygen Consumption of Normal and Atherosclerotic Intima.

Circulat. Res. 9, 571-575 (1961)

100. WHEREAT, A.F.

Lipid Biosynthesis in Aortic Intima from Normal and Cholesterol-Fed Rabbits.

J. Atheroscler. Res. 4, 272-282 (1964)

101. WHEREAT, A.F.

Fatty Acid Synthesis in Cell-Free System from Rabbit Aorta.

J. Lipid Res. 7, 671-677 (1966)

102. WOERNER, C.A.

Vasa Vasorum of Arteries, Their Demonstration and Distribution.

In: The Arterial Wall; edt. by LANSING, A.I., pp. 1-14 Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins (1959)

103. WOLINSKY, H., GLAGOV, S.

Comparison of Abdominal and Thoracic Aortic Medial Structure in Mammals.

Circulat. Res. 25, 677-686 (1969)

LEBENSLAUF

Am 22. Juni 1944 wurde ich, Hermann Eberhard Knehr, als Sohn des Gerichtsassessors Heinz Knehr und seiner Ehefrau Hilde, geb. Kirchgeorg, in Breslau geboren.

1950—1964	Besuch der Rudolf Steiner-Schule in Nürnberg
22. Juli 1964	Reifeprüfung
1964—1967	Studium der Chemie an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
1967—1970	Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
7. Dezember 1970	Diplomprüfung Chemie
3. Juli 1973	Promotion zum Dr. rer. nat. (summa cum laude)
1973—1976	Wiss. Assistent am Physikal.-chem. Institut der Universität Tübingen
1977—1982	Wiss. Assistent, später Hochschulassistent am Physiologischen Institut (Lehrstuhl I) der Universität Tübingen
1976—1982	Studium der Medizin an der Universität Tübingen
30. April 1982	Ärztliche Prüfung